

Zeszyt Studentów Biotechnologii

ACTA MYGENICA

numer 7

Kraków, luty 2015

Od redakcji

DRODZY CZYTELNICY!

Witamy Was na łamach siódmego już numeru naszego czasopisma! Szczególnie cieszymy się z ogromnego poszerzenia zasięgu Acty, co zaowocowało w ogromnym napływie artykułów z różnych części kraju!

Bardzo zadowala nas też szeroki zakres tematyczny, dzięki czemu nasze czasopismo staje się platformą, gdzie przedstawiciele wielu gałęzi nauk przyrodniczych odnajdą coś dla siebie. Zapraszamy do lektury!

Zespół redakcyjny

Jan Majta
Dobrochna Dolicka
Irma Gryniuk
Agata Kalita
Róża Pietrzycka
Agnieszka Seretny
Marta Tempes

Okładka

Jan Majta
Magdalena Firlej
Anna Rozlach

Skład

Jan Majta

Wydawca

KNSB Mygen

Nakład 500 szt.

Kontakt

jan.majta@gmail.com

ISSN 1899-5535

Sfinansowane przez:



RADA KÓŁ NAUKOWYCH
UNIwersYTETU
JAGIELLOŃSKIEGO

Spis treści:

Joanna Fedorowicz

Etiologia chorób Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelit 11

Jabłońska Monika, Kołomycka Agnieszka, Orłowska Karina

Interferencja RNA: potranskrypcyjne wyciszanie genów 21

Agnieszka Sikora, Krystyna Demska-Zakęś

Innowacyjne technologie manipulacji płcią ryby 26

Anna Zabłocka, Sylwia Szeląg , Klaudia Trzeciak

Mezoporowate nanostruktury krzemionkowe jako potencjalny nośnik leków -badania in vitro 35

Adrian Podkowa, Karolina Podkowa

Błonowe transportery dla kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) jako potencjalny cel terapeutyczny dla leków stosowanych w chorobach ośrodkowego układu nerwowego 46

Adrian Augustyniak

Porównanie efektywności wybranych metod lizy komórek *Streptomyces* spp. w procesie izolacji całego genomowego DNA 53

Edyta Bańcyr, Marcin Żyromski

Zwierzęta laboratoryjne: chów i hodowla w warunkach zgodnych z obowiązującymi normami 59



VI Studencka Konferencja Biologii Ewolucyjnej

Konferencja porusza zagadnienia biologii ewolucyjnej wszystkich organizmów żywych w zakresie zarówno nauk przyrodniczych jak i humanistycznych.

Zaproszenie jest skierowane do: studentów, doktorantów, pracowników naukowych i pasjonatów biologii, którzy chcą podzielić się swoimi zainteresowaniami lub wynikami badań naukowych.

Konferencja odbędzie się 9 - 11 maja w Krakowie,

w budynku Instytutu Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego przy ul. Gronostajowej 7.

Zgłoszenia uczestników prezentujących referaty i postery będą przyjmowane do 16 marca 2014 roku. Termin nadsyłania abstraktów upływa 31 marca 2014 roku.

Opłata konferencyjna dla uczestników wyniesie ok. 70 zł z noclegiem i ok. 50 zł bez noclegu. Konferencja jest bezpłatna dla wolnych słuchaczy, którzy nie korzystają z zapewnionego przez organizatorów noclegu, wyżywienia i materiałów.

Organizator:



Zgłoszenia są przyjmowane drogą elektroniczną. Zainteresowani są proszeni o wypełnienie kwestionariusza, który znajduje się na stronie:

www.skbe.tk

Wszelkie pytania prosimy kierować na adres:

konf.biolewo@gmail.com

Dokładne informacje i program konferencji zostaną ogłoszone wkrótce.

**III STUDENCKA KONFERENCJA
BIOLOGII MEDYCZNEJ**

22-24 maja 2015 • Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii



biofuzje

Od naukowca do menedżera: moja działalność naukowo-menedżerska w Naukowym Kole Mikrobiologów Molekularnych „COCCUS”

Czas bardzo szybko mija. Można powiedzieć, że za szybko; szczególnie wtedy jak się jest skupionym na prowadzeniu badań do pracy doktorskiej i zajmowaniu stanowiska Prezesa Koła naukowego. Moja przygoda z działalnością Koła Naukowego zaczęła się w sposób przypadkowy. Z czystej ciekawości. Będąc na pierwszym roku studiów doktoranckich. Akurat tak się składa, że jestem doktorantką na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa. Doktorat robię w dyscyplinie Agronomii, zaś badania do pracy doktorskiej w Katedrze Fitopatologii. Sama praca dotyczy zagadnienia monokultur zbożowych. Któregoś październikowego dnia w roku 2011 mój kolega (który również jest na doktoracie) zaprosił mnie na spotkanie wprowadzające dla nowych członków KN Coccus. Nie pamiętam dokładnie o czym był jego wykład, ale obecność Opiekuna naukowego- Pana dr inż. Karola Korzekwy oraz innych nowych dla mnie twarzy sprawiły, iż chciałam tak samo jak Oni, zająć się nauką w wolnych chwilach. Po skończonym zebraniu Opiekun naukowy zapytał nas czym chcielibyśmy się zajmować w ramach koła. Odparłam, że mnie interesuje tematyka pasz. W ten sposób narodziły się moje pierwsze badania. Razem z innymi członkami Koła jeszcze w tym samym tygodniu zabraliśmy się za prace laboratoryjne. Owocem naszych prac badawczych były prace prezentowane podczas Seminarium Kół Naukowych organizowane przez Uniwersytet Warmińsko-Mazurski. To był dla nas dobry rok. Bo nie dość, że zaprezentowaliśmy kilka prac na forum naukowym to jeszcze mieliśmy głowę pełną fajnych po-

myśłów na działalność popularyzatorską koła.

Zależało nam bardzo na pozyskaniu nowych osób i „zarażenie” studentów różnych wydziałów tematyką mikrobiologii. Tak naprawdę w każdej dziedzinie życia można znaleźć kontekst mikrobiologiczny. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski organizował Dzień Otwartych Drzwi. Wydarzenie to skierowane było na osoby kończące klasy maturalne i jednocześnie promowano wszystkie wydziały uniwersytetu oraz agendy studenckie. Nas oczywiście nie mogło zabraknąć. Nastął czas wyteżonej pracy PR-owskiej Koła. Ustalaliśmy jak będzie wyglądać nasze stoisko, jak przygotujemy smycze oraz identyfikatory z imionami członków KN. Co będziemy mówić, jak zachęcać ludzi żeby do nas się przyłączyli oraz co możemy zaprezentować. Impreza promocyjna była naprawdę świetna. Myślę, że zarówno wystawcy jak i przyjezdni (a było ich dużo) byli zadowoleni. Po wydarzeniu związanym z promocją Uniwersytetu były organizowane Dni DNA- Encyklopedia Życia. Wydarzenie ogólnopolskie prowadzone przez agendę ASSB. Razem z trzema Kołami naukowymi wydziału Biologii i Biotechnologii zżawo zabraliśmy się do pracy. Ustalaliśmy tematykę wykładów, ćwiczeń, warsztatów, konkursów dla dzieci i młodzieży, w taki sposób żeby najmłodsi zafascynowali się nauką. Kolejna udana akcja. Były jeszcze takie przedsięwzięcia jak organizacja kolejnego Międzynarodowego Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie. Jednak nie samą nauką człowiek żyje. Bardzo dobrze wspominam sobie czas wolny spędzony na

świeżym powietrzu w gronie młodych naukowców z wydziału Biologii i Biotechnologii oraz Bioinżynierii Zwierząt. Mielśmy taką zasadę, że każde wykonane przedsięwzięcie czy podsumowanie roku trzeba było uczcić w sposób szczególny. Przy ognisku, z muzyką, w dobrym towarzystwie oraz w świetnym humorze. Organizacja wielu przedsięwzięć zabierała dużo czasu, wymagała poświęcenia oraz czasami nie obyło się bez nerwów. Jednak robienie wszystkiego jak najlepiej skutkowało bardzo dobrą organizacją i osiągnięciem wielu sukcesów. Podczas organizacji różnych wydarzeń naukowych znajdowaliśmy czas na swoje studia oraz badania kołowe. Charakteryzowała nas dobra organizacja pracy. Prezentowaliśmy swoje wyniki badań w formie posterów czy referatów w wielu miastach Polski. Nasze badania cechowała szeroko pojęta naukowość. Nasz dorobek naukowy był prezentowany na konferencjach przyrodniczych, studenckich, mikrobiologicznych, ochrony środowiska, biologii molekularnej. Wychodziliśmy z założenia, że musimy sami dbać o nasz rozwój naukowy. Kiedy tylko nadarzała się okazja korzystaliśmy z niej. Niedawno dowiedziałam się, że nasze koło Coccus jest uważane za najaktywniejsze koło wśród aktywnych KN na UWM. Wiadomość ta zmotywowała nas do pracy w kolejnym roku akademickim. Cieszę się, że mogłam współpracować z wieloma ludźmi. Dzięki temu zawiązałam wiele nowych znajomości, które trwają po dziś dzień. Każdy z członków KN miał możliwość realizacji własnych pomysłów i badań i może to właśnie sprawiło, że tyle ciekawych pomysłów ujrzało światło dzienne. Bo przecież każdy z nas jest inny i ma różne zainteresowania naukowe.

Tak mijają moje cztery lata doktoratu. Je-

stem na IV roku studiów doktoranckich. Przez te cztery lata wiele się wydarzyło. Były momenty lepsze i gorsze w działalności Koła. Ale najogólniej mówiąc to był najlepiej spędzony czas wolny związany z nauką, poświęcony na realizację badań w Katedrze Mikrobiologii Środowiskowej. Obecnie Opiekunem naukowym Koła jest Pani dr inż. Monika Harnisz. Jest nowy zespół badawczy. Co ciekawe również tak samo dynamiczny w działaniu i wykazujący inicjatywę w przeprowadzaniu badań i chęci pisania publikacji oraz prezentacji wyników na konferencjach. Takim ludziom po prostu nie odmawia się pomocy. Chociaż jak odszedł od nas wcześniejszy opiekun koła postanowiłam nie zajmować się kołem. A poświęcić czas na pisanie rozprawy doktorskiej. Tak się jednak nie stało. Pracuję i nadal uczestniczę w pracach organizacyjno-badawczych koła. Pomagam nowej opiekunce jak i członkom koła. Zarówno wcześniejsza jak i obecna ekipa osób działających w kole jest wspaniała, pracowita i entuzjastycznie nastawiona do działania. Teraz zajmujemy się organizacją XLIV Międzynarodowego Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie. Mamy ręce pełne roboty naukowej i organizacyjnej. Jest dobrze.

Dziękuję ówczesnemu Opiekunowi KN Panu dr inż. Karolowi Korzekwie- bo to on we mnie dostrzegł zdolności menedżerskie i nauczył mnie bardzo dużo na temat biologii molekularnej. Jednocześnie Pani dr inż. Monice Harnisz życzę wszystkiego najlepszego w prowadzeniu Koła Naukowego.

Mgr inż. Natalia Machałek

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Katedra Fitopatologii, Wydział Nauk o Środowisku, Katedra Mikrobiologii Środowiskowej

symbioza czwarta edycja
29-31 maja

wiecej informacji wkrótce na
www.msb.symbioza.edu.pl oraz facebook.com/msbsymbioza



Koło Naukowe Genetyki oraz Koło Naukowe
Studentów Biotechnologii „MyGen” działające
na Uniwersytecie Jagiellońskim serdecznie
zapraszają studentów wszystkich stopni i
doktorantów na



I Studencką Konferencję Genetyczną



Konferencja obejmuje genetykę wszystkich organizmów zarówno na poziomie pojedynczych osobników jak i całych populacji. Zaproszenie skierowane jest do młodych badaczy i pasjonatów z kierunków przyrodniczych interesujących się różnymi dziedzinami genetyki, zarówno prowadzących własne badania jak i dopiero zaczynających swoją przygodę z nauką.

Konferencja odbędzie się 24 - 26 kwietnia 2015r. w Krakowie
w Instytucie Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego przy ul. Gronostajowej 9.

Zgłoszenia uczestników będą przyjmowane do 22 marca 2015r.

Termin nadsyłania abstraktów upływa 31 marca 2015r.

Opłata konferencyjna wynosi 50 zł. Zgłoszenia są przyjmowane drogą elektroniczną. Zainteresowane osoby są proszone o wypełnienie i wysłanie formularza na stronie konferencji:

www.genomicauj.wix.com/genomica

Wszelkie pytania prosimy kierować na adres:

genomica.uj@gmail.com

Etiologia chorób Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelit

Joanna Fedorowicz

Gdański Uniwersytet Medyczny

jfedorowicz@gumed.edu.pl

Choroby należące do nieswoistych zapaleń jelit, takie jak choroba Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelit, mają złożony zespół przyczyn. Oba schorzenia posiadają zbliżone objawy kliniczne, miejsce występowania zmian patologicznych oraz w ich terapiach stosuje się podobne metody leczenia. W niniejszej pracy omówione zostały główne czynniki genetyczne wpływające na rozwój choroby oraz możliwy wpływ podłoża środowiskowego z głównym naciskiem na czynniki mikrobiologiczne.

Na podstawie wyników badań z wykorzystaniem mikromacierzy do analizy transkrypcji genów komórek linii HT29 inkubowanych kolejno z patogennymi szczepami E. coli UM146 i UM147 oraz probiotycznym szczepem E. coli Nissle 1917 wykonane zostały analizy bioinformatyczne, wyniki zostały zestawione pod kątem indukowania apoptozy w komórkach ludzkich przez mikroorganizmy chorobotwórcze stanowiące źródło zapalenia w omawianych schorzeniach.

Wstęp

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) i choroba Leśniowskiego-Crohna (LC) są to dwa najpowszechniejsze schorzenia z grupy nieswoistych zapaleń jelit (IBD). Etiologia obu chorób nie jest do końca poznana i zdefiniowana ze względu na złożoność czynników wpływających na rozwój procesu zapalnego. Wśród wielorakich przyczyn badacze wymieniają predyspozycje genetyczne oraz wpływy środowiskowe (mikrobiologiczne czy związane z trybem życia) powodujące zaburzenie odpowiedzi układu immunologicznego i w konsekwencji trudne do wyleczenia zapalenia. W ostatnich czasach stały się one znaczącym problemem cywilizacyjnym. Od pół wieku odnotowuje się coraz większą zapadalność na nieswoiste zapalenia jelit, zwłaszcza w państwach wysoko rozwinię-

tych, chociaż najświeższe doniesienia świadczą o stabilizacji tendencji gwałtownych zachorowań w ostatnim dziesięcioleciu [1]. Najbardziej narażone są osoby młode pomiędzy 20 a 40 rokiem życia oraz dzieci. Obserwuje się również częste występowanie wśród osób z przedziału wiekowego 60 - 80 [1-3]. Terapia jest złożona i zależna od rozległości zmian, często wymaga od pacjenta zmiany dotychczasowego trybu życia.

W nieswoistych zapaleniach jelit medycyna ma szerokie pole do działania. Dokładniejsze zrozumienie działania genów i białek kluczowych w procesie patogenezy umożliwi odkrycie nowych, skuteczniejszych metod leczenia. Także możliwe będzie szybkie ocenienie racjonalnego ryzyka wystąpienia choroby oraz dokładniejsze roz-

poznanie i łagodzenie objawów przypadłości. Badania biologii molekularnej są podstawą do zrozumienia przyczyn oraz opracowania technik przeciwdziałania IBD.

Czynniki genetyczne

Przypuszcza się, że genetyczne przyczyny IBD stanowią 60% udziału w patogenezie LC, a 40% we WZJG [1], przy czym sposób dziedziczenia nie odpowiada klasycznemu modelowi jednogenowego dziedziczenia mendlowskiego. Obie jednostki chorobowe charakteryzują się heterogennym, wielogenowym systemem przekazywania pokoleniowego. Ryzyko zachorowania u krewnych jest 10 razy większe przy WZJG, natomiast dla LC jest ono podniesione, ale nieznacznie [3]. Schemat dziedziczenia jest więc odmienny, ale pewne nieprawidłowości genetyczne w obu chorobach są zbliżone.

Przyczyną IBD jest zaburzenie regulacji odpowiedzi układu immunologicznego. Odpowiadają za to m. in. mutacje w genach odpowiedzialnych za odporność. Do genów związanych z powstawaniem IBD można zaliczyć SLC11A1, IRGM, ATG16L1, AAT i NOD2. Geny te kodują białka, które pełnią nadrzędną rolę w procesach fagocytozy i autofagocytozy [4] oraz wpływają na inne komponenty układu odpornościowego. Mutacje pojedynczych nukleotydów w ww. genach mogą prowadzić do zachwiania homeostazy jelitowej, która bazuje na utrzymaniu równowagi pomiędzy komórkami nabłonka jelit a odpornościowymi. Inwazja i проникnięcie drobnoustrojów przez błonę śluzową jelita powoduje reakcję komórek odpornościowych, które inicjują proces wywołania reakcji zapalnej, regeneracji lub tolerancji immunologicznej, a mutacje zaburzają działanie podstawowych mechanizmów obronnych organizmu: zdolność

regeneracyjną nabłonka jelit czy możliwości obronne przeciwko drobnoustrojom patogennym. Zakłócona zostaje równowaga pomiędzy proliferacją a apoptozą i autofagocytozą komórek zniszczonych chorobowo, uszkodzone zostają niektóre szlaki metaboliczne. Odpowiedź układu odpornościowego we WZJG i LC można więc porównać do reakcji nadwrażliwości czy występującej w chorobach autoimmunologicznych [5].

ATG16L1

Białko kodowane przez gen ATG16L1 związane jest bezpośrednio z autofagią komórek. Proces ten występuje we wszystkich komórkach eukariotycznych, zdrowych i patologicznych. W autofagocytozie degradowane są uszkodzone, zbędne bądź obumarłe elementy strukturalne komórek. Zależy ona od ok. 30 białek ATG, które odpowiadają za wytworzenie i usunięcie autofagosomu. Zlikwidowanie pęcherzyka jest możliwe dzięki fuzji z lizosomami, która warunkowana jest udziałem ATG16L1 łączącym się z membraną autofagosomalną [6].

ATG16L1 ulega ekspresji w nabłonku jelita oraz w leukocytach. Podczas infekcji komórka bakteryjna zostaje zfagocytozowana przez komórkę gospodarza i zachodzi wakuolizacja patogenu. Aby usunąć zwakuolizowaną bakterię w wodniczkę fagocytarnej, niezbędne jest połączenie jej z lizosomem zawierającym kwaśne enzymy trawienne unieszkodliwiające patogen. Punktowa mutacja genu ATG16L1, w której treonina z pozycji 300 zostaje zastąpiona alaniną stanowi czynnik predysponujący wysokiego ryzyka choroby LC, może naruszać lub całkowicie zablokować autofagocytozę [7]. Defekt ten powoduje m. in. namnażanie się bakterii w wodniczce fago-

cytarnej i może doprowadzić do ich uwolnienia do cytoplazmy lub rozprzestrzenienia się z komórki do komórki.

NOD2

Białko NOD2 nazywane również CARD15 występuje na powierzchni monocytów, makrofagów, komórek dendrytycznych i nabłonkowych jelit [4]. Pełni ono istotne funkcje w procesach autofagocytozy i w unieszkodliwianiu patogenów. Mechanizm jego aktywacji polega na zmianie konformacji białka przy wnikięciu bakterii w głąb cytoplazmy komórki gospodarza, gdy dochodzi do zetknięcia się jego domeny wiążącej MDP z dipeptydem muramylowym (MDP). Aktywowany zostaje czynnik transkrypcyjny NF- κ B, następnie dostaje się on do jądra, gdzie rozpoczyna się produkcja cytokin prozapalnych [8].

Białko CARD15 jest również eksprymowane w komórkach Panetha. Jego występowanie wiąże się z syntezą peptydów działających przeciwbakteryjnie, defensyw, cytokin i chemokin. Ma ono także istotne znaczenie w procesie apoptozy. Wpływa na zdolność wytwarzania reaktywnych form tlenu przez oksydazy z rodziny NOX oraz wspomaga transport ATG16L1 do błony pęcherzyka fagocytarnego [9]. Według najnowszych odkryć polimorfizm Arg702Trp, Gly908Arg i Leu1007fsinsC w sekwencji aminokwasowej jego domeny LPR powoduje wzmożoną skłonność do zachorowania na LC. Mutacje powodują utratę zdolności do wiązania się z MDP, co prowadzi do powstania dysfunkcji w działaniu odpowiedzi immunologicznej, brakiem usuwania patogenów i wyniszczeniem nabłonka jelit [10].

IRGM

IRGM to białko GTPazy z rodziny M zaliczane do GTPaz związanych z odpornością [4]. Badania na modelu mysim świadczą

o tym, że jest ono najsilniejszym białkiem odporności wrodzonej przeciwko pasożytom wewnątrzkomórkowym. Ma ono niezmienne istotną funkcję w procesie autofagocytozy. Zarówno zbyt niski, jak i za wysoki poziom jego ekspresji jest niepożądany. W pierwszym przypadku zmienia się zdolność autofagocytarna, co predysponuje do powstania LC. Podwyższona ekspresja stymuluje ów proces, przez co chroni błonę śluzową jelita. W niezmienionym chorobowo nabłonku okrężnicy IRGM osiąga wysoki poziom ekspresji, znacznie wyższy niż u pacjentów z chorobą LC. Ekspresja białka podnosi się również w stanach zapalnych błony śluzowej jelit i wobec zwiększonej ilości patogenów zewnątrzkomórkowych w tkance nabłonkowej. Jednak w przypadku nadekspresji efektywność autofagocytozy zmniejsza się i wewnątrz komórek nabłonkowych obserwowana jest duża ilość przetrwałych patogenów [11]. Mutacje SNP w genie IRGM powodujące zmianę sekwencji aminokwasów w białku mogą prowadzić do zakłócenia autoregulacji jego syntezy, co powoduje podtrzymanie przewlekłego stanu zapalnego w jelicie.

SLC11A1

Białko nazywane inaczej NRAMP1 to proteina naturalnej odpowiedzi związanej z makrofagami 1. Gen SLC11A1/NRAMP1 koduje integralne białko błonowe, które ulega ekspresji w komórkach efektorowych układu immunologicznego, takich jak monocyty, makrofagi i neutrofile, oraz w komórkach kubkowych nabłonka jelita cienkiego i krętego [5, 12]. Posiada zachowawczy ewolucyjnie motyw transportowy wiążący jony żelaza Fe²⁺ i innych metali na drugim stopniu utlenienia (mangan, miedź, magnez czy cynk), co pozwala to na regulację poziomu ich stężenia. Podczas

infekcji, gdy bakteria zostaje zamknięta przez komórkę eukariotyczną w fagosomie, SLC11A1 kotwiczony się w błonie wakuoli i wypompowuje z jej wnętrza dwuwartościowe jony metali. Dzięki temu rozwój patogenu wewnątrzkomórkowego jest zahamowany oraz uniemożliwione zostaje ponowne uwolnienie mikroorganizmu z makrofaga gospodarza [13, 14]. Ponadto ma on znaczący wpływ na szybkość gojenia się ran. Po wykonaniu knockout genu *Nramp1* u myszy obserwowano opóźniony czas gojenia po zranieniu oraz 10-krotnie niższy poziom ekspresji SLPI [14, 15]. Nieobecność genu *Nramp1* zmienia więc pośrednio stężenie innego białka poprzez regulację genu SLPI, niezwykle ważnego we WZJG. SLPI jest inhibitorem szerokiego zakresu proteaz, włączając chymotrypsynę, elastazę i trypsynę. Działa antagonistycznie wobec HLE, ludzkiej elastazy leukocytovej, która jako proteaza ma zdolność do degradacji białek gospodarza w pewnych defektach genetycznych, ma działanie przeciwbakteryjne (blokuje powiązanie LPS na receptorach makrofagów) i przeciwgrzybicze. Wykryto także jego aktywność przeciwko wirusowi HIV oraz przez hamowanie aktywacji NF- κ B właściwości przeciwzapalne.

SLC11A1 kontroluje też ekspresję białka NOD2 [12], pobudza i aktywuje do różnicowania makrofagi, wpływa na ekspresję enzymu syntazy tlenu azotu, białek MHC II oraz cytokin IL β i prozapalnego czynnika TNF α , który odgrywa kluczową rolę w inicjacji procesu zapalnego. Nadprodukcja TNF α w tkance nabłonkowej jest charakterystyczna dla nieswoistych zapaleń jelit i odpowiada za nadmierną odpowiedź immunologiczną.

Poziom syntezy białka NRAMP1 zależy

jest od genotypu. Wadliwe funkcjonowanie genu NRAMP1, mutacje, delecje czy insercje, podnoszą niebezpieczeństwo zachorowania nie tylko na wrzodziejące zapalenie jelita grubego, ale również reumatoidalne zapalenie stawów czy cukrzycę typu 1.

AAT

α 1-antytrypsyna kodowana przez gen SERPINA1, nazywany również AAT lub A1AT, jest białkiem osocza z frakcji α 1-globulin. Glikoproteina AAT zaliczana jest do białek ostrej fazy, jej synteza zachodzi w wątrobie. Wytwarzana jest również przez makrofagi i komórki nabłonkowe jelita i komórki Panetha znajdujące się w obrębie jelita czczego. Stężenie AAT wzrasta w przypadku wystąpienia aktywnego stanu zapalnego, gdyż jest ona jednym z najsilniejszych inhibitorów proteaz serynowych. Ma zdolność do blokowania aktywności enzymów proteolitycznych, inaktywuje elastazę neutrofilową uwalnianą w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne przez granulocyty obojętnochłonne. W przypadku braku AAT elastaza może mieć działanie niszczące i uszkadzać tkankę łączną organizmu [16-18]. AAT występuje w kilku odmianach allelicznych (prawidłowa oznaczana jako M), niektóre z nich mogą nie wpływać na aktywność enzymu, jednak odmiany genu S i Z stanowią predyspozycję w kierunku wystąpienia LC [12].

Czynniki środowiskowe

Nieswoiste zapalenia jelit nie posiadają jednego czynnika limitującego, wiele elementów przyczynia się do rozwoju choroby. Uwarunkowania genetyczne mogą stanowić ryzyko predysponujące do powstania schorzenia, ale istnieje również wiele składników środowiskowych zwiększających skłonność zachorowania na IBD. Należą do nich m. in. palenie tytoniu

(powszechnie dowiedziono, że nikotyna oraz związki zawarte w dymie papierosowym mają wpływ na rozwój reakcji zapalnej, jednak mechanizm wpływu palenia w nieswoistych zapaleniach jelit nie został dotąd dość dobrze poznany [1]), dieta (wg. lekarzy eliminacja z diety mleka krowiego u chorego z WZJG powoduje poprawę, natomiast dla LC łagodzenie objawów obserwuje się przy stosowaniu diety płynnej [2]), stres (stan psychiczny pacjenta może odbijać się na jego zdrowiu fizycznym, jednak nie jest to czynnik bezpośredni – osoby stale narażone na negatywny stres, np. w wymagającej pracy czy przy pewnych przeciwnościach losowych mogą przechodzić ostrzejsze rzuty choroby, a pozytywny stres, taki jak polepszenie sytuacji zawodowej czy podjęte wyzwania dające satysfakcję mogą prowadzić do długotrwałych remisji choroby i braku objawów nawet przez rok, jednym z mechanizmów wpływu wzmożonego napięcia psychicznego na rozwój choroby może być pobudzanie białych krwinek przez zakończenia nerwów trzewnych znajdujących się w ścianie jelita, rola czynników psychologicznych jest jednak jedynie poboczna, a nie limitująca źródło choroby), a niektóre hipotezy mówią o zwiększonym ryzyku zapadalności na choroby IBD u osób, które w okresie dzieciństwa utrzymywane miały przesadnie wysokie standardy higieniczne [1].

Czynniki mikrobiologiczne

Bakteryjna etiologia jako początek IBD stanowi jedynie hipotezę, jednak badania świadczą o ważnej roli mikroorganizmów w rozwoju LC i WZJG. Wśród konkretnych przyczyn wymienia się amebozę czy czerwone bakterie (shigellozę) jako pierwotne źródło rozwoju choroby. Ponadto remisje w zapaleniach u około 2/3 pacjen-

tów z nieswoistymi zapaleniami jelit stosującymi antybiotyki (mesalazynę i rifaksyminę) dowodzi jednoznacznie do związku pomiędzy bakteriami a stanami zapalnymi [1]. Probiotyki zawierające drobnoustroje fizjologicznej flory jelitowej człowieka wykazują zaś działanie poprawiające kondycję pacjenta.

Istotną rolę w przedłużającym się stanie zapalnym ma kontakt błony śluzowej jelita z przesuwającą się masą kałową. Mikroorganizmy wykorzystują słabe punkty działania systemu odpornościowego, w czynnej fazie zapalenia występuje nietolerancja immunologiczna własnej mikroflory bakteryjnej. Czynnik mikrobiologiczny jest więc potencjalnym punktem uchwytu w walce z chorobą.

Cel i zakres badań

Zamierzeniem zespołu było zbadanie interakcji gospodarz – patogen na podstawie analizy oddziaływania jelitowej linii komórkowej z patogennymi szczepami *E. coli* wyizolowanymi od pacjentów z LC i WZJG oraz identyfikacja genów, których transkrypcja w tkance jelitowej następuje wskutek odpowiedzi na zakażenie. Wytypowanie genów związanych z odpowiedzią komórkową na infekcję bakteryjną spowodowaną szczepem chorobotwórczym, w porównaniu do reakcji na szczep probiotyczny, miało na celu umożliwienie lepszego zrozumienia mechanizmu rozwoju zapalenia jelit, zwłaszcza roli apoptozy w obu schorzeniach. Aby to osiągnąć, komórki linii HT29 (ludzki gruczolak okrężnicy) inkubowano z dwoma szczepami: *E. coli* UM146 (izolowany od pacjentów z LC) i *E. coli* UM147 (analogicznie WZJG). Użyto również szczepu *E. coli* Nissle 1917, który stanowił kontrolę, jako szczep niepatogenny. Do identyfikacji wyników posłużyła mikroma-

cierz Affymetrix® GeneChip HG-U133A Plus 2.0 [19].

Oba chorobotwórcze szczepy posiadają fimbrie S, toksynę autotransportującą umożliwiającą wakuolizację komórek należącą do autotransporterów proteaz serynowych (SPATE) oraz antygen 43 pośredniczący w autoagregacji komórek *E. coli*. Ponadto szczep *E. coli* UM146 wytwarza fimbrie P (odpowiadają za adhezję bakterii do odpowiednich receptorów, np. DAF komórek nabłonkowych układu moczowego), a *E. coli* UM147 ma enzym o aktywności trypsyny (powoduje on hydrolizę połączeń międzykomórkowych w linii HT29) [19].

Przebieg eksperymentu

Pojedyncze kolonie szczepów *E. coli* UM146 i UM147 izolowanych od pacjentów z LC i WZJG inkubowano przez 18 godzin w 10 ml pożywki LB w 37°C. Po inkubacji 1 ml kultury bakteryjnej (ca. 10⁷ CFU) dodawano do butli hodowlanych o powierzchni dna 75 cm², w których hodowla linii HT29 stanowiła 70% powierzchni dennej. Do trzeciej butli dodano szczepu Nissle 1917 jako kontrola. Próbkę inkubowano 3 godziny w 37°C w obecności 5% CO₂. Komórki oddzielano od powierzchni dolnej roztworem trypsyny, zawiesinę odwirowywano i izolowano RNA z próbek [19]. RNA zostało poddane biotylnowaniu, następnie naniesione na mikrochipy zawierające 54 675 sond molekularnych. Hybrydyzacja northern blotting z jednoniciowym DNA sondy zachodziła przez 12 godzin w piecu hybrydizacyjnym. Następnie do detekcji użyto roztworu wybarwiającego. Awidyna z przyłączonym enzymem peroksydazy chrzawowej wiązała się do biotyny z RNA próbek. W wyniku reakcji enzymatycznej z sub-

stratem powstawał fluorescencyjny produkt, którego stężenie było proporcjonalne do ilości RNA związanego z sondą. Detektor na podstawie intensywności świecenia przypisywał wartości świadczące o poziomie transkrypcji dla poszczególnych badanych sekwencji genowych. Analizowane były te geny, dla których wystąpiła widoczna nadekspresja w komórkach inkubowanych ze szczepami patogennymi w stosunku do komórek ze szczepem probiotycznym. Eksperyment powtórzono dwukrotnie celem ustalenia powtarzalności uzyskanych danych. Rezultaty zostały zinterpretowane poniżej.

Dyskusja wyników

Na podstawie bioinformatycznej analizy dokonano porównania interakcji komórek eukariotycznych linii HT29 z bakteriami *E. coli*. Zidentyfikowano szereg genów, dla których wystąpiła znacząca (powyżej dwukrotna) nadekspresja w komórkach linii HT29 inkubowanych ze szczepami patogennymi w stosunku do komórek HT29 inkubowanych ze szczepem probiotycznym. Do rozkodowania sond i przypisania im odpowiednich genów na podstawie ich symboli wykorzystano program DAVID [20]. W tabeli 1. przedstawiono geny, których pozytywna regulacja uczestniczy w wywoływaniu śmierci komórki, dla których wystąpiła nadekspresja w poszczególnych powtórzeniach eksperymentu. Część wspólna to geny, które ujawniły się w obu próbach.

Oba testy wykazują istnienie pewnej płaszczyzny jednoznaczności, jednak obserwowane są również występujące różnice. W celu dokładniejszego zbadania należałoby przeprowadzić analizę z użyciem metody RT-PCR.

Geny powtarzające się dla obu ekspery-

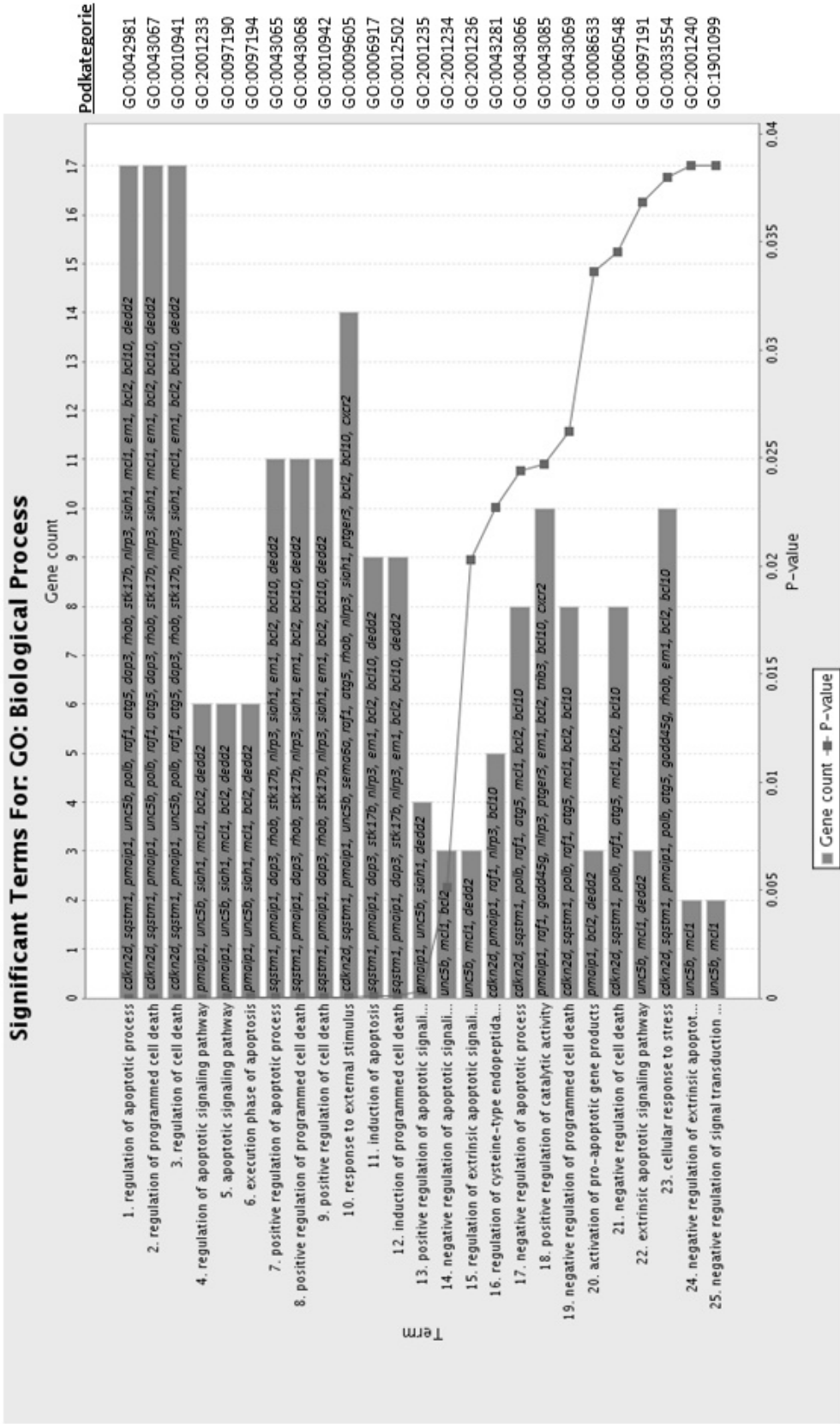
Nr eksperymentu	Liczba genów nadeksprymowanych	Lista genów
1	52	foxo3b, cxcr2, pmaip1, shb, top1, mcl1, map3k5, cdkn2d, rhob, fosl2, gadd45g, dedd2, nanp, bcl10, ptger3, cd40, nlrp3, bcl2l11, eif4g2, unc5b, ern1, aven, peg3as, siah1, polb, ell, tnfaip3, ppp1r15a, stk17b, trib3, il17a, atn1, c8orf4, bcl2, grik2, sqstm1, col4a3, c10orf2, atg5, rybp, raf1, dbc1, gas1, e2f2, tnfsf9, srgn, sema6a, syne1, csrn1, slc5a8, faf1, dap3
2	74	cadm1, zak, ppp3r1, fgf14, cxcr2, foxo3, pmaip1, kcnc3, plg, top1, mcl1, cdkn2d, rhob, casp1, gadd45g, nanp, dedd2, bcl10, ptger3, tbrg4, prkcg, nlrp3, dapk2, wdr92, eif4g2, unc5a, unc5b, ern1, siah1, peg3as, polb, mdm4, dapk3, tia1, stk17b, trib3, ube4b, fam176a, ppm1f, fis1, msh2, eya2, atn1, ttbk2, bcl2, c8orf4, tnfrsf19, xaf1, sqstm1, ube2z, ahr, c10orf2, fas, casp8ap2, il1a, atg5, rybp, dbc1, raf1, kiaa1967, e2f2, tnfsf9, tp73, fxr1, dnase1, sema6a, p2rx1, jmjd6, tdp1, csrn1, loc727978, osm, bre, dap3
1 i 2 (część wspólna z obu eksperymentów)	34	atg5, atn1, bcl10, bcl2, c10orf2, c8orf4, cdkn2d, csrn1, cxcr2, dap3, dbc1, dedd2, e2f2, eif4g2, ern1, gadd45g, mcl1, nanp, nlrp3, peg3as, pmaip1, polb, ptger3, raf1, rhob, rybp, sema6a, siah1, sqstm1, stk17b, tnfsf9, top1, trib3, unc5b

Tabela 1. Wybrana kategoria cell death w Gen Ontology dla grupy genów nadeksprymowanych istotna z punktu widzenia przeżywalności komórek linii HT29 zainfekowanych chorobotwórczymi szczepami E. coli 146UM oraz E. coli 147UM. Analizę przeprowadzono przy użyciu programu Expander wersja 6 [21]

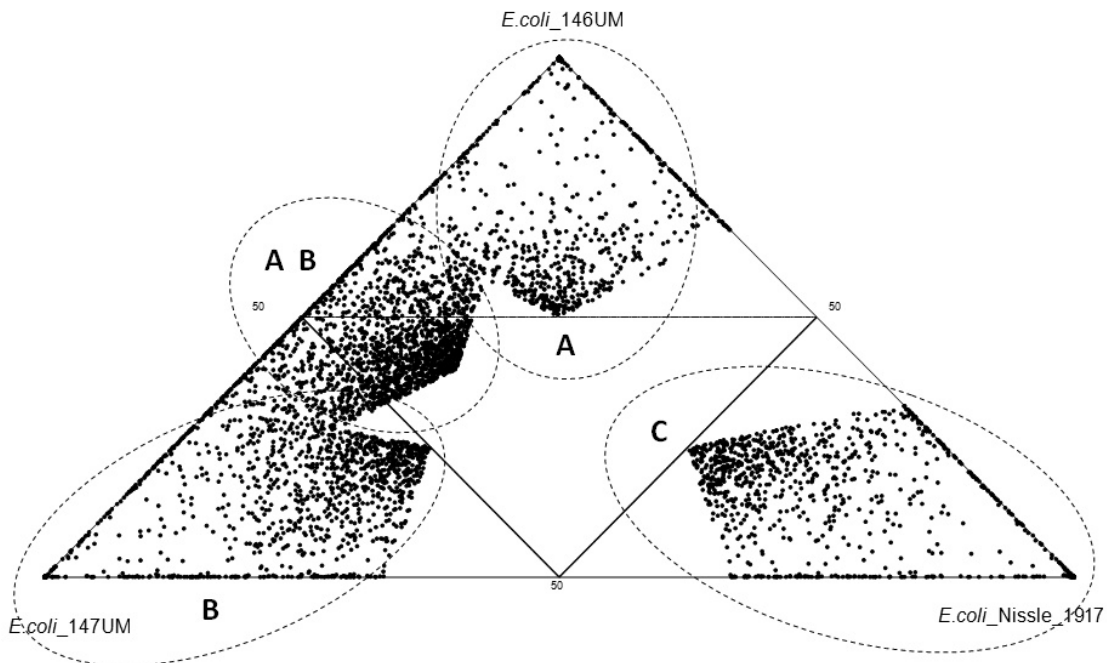
mentów zostały zgrupowane w programie ToppFun (Rysunek 1) w zależności od pełnionych przez nie funkcji na podkategorię. Niektóre z nich występują w kilku podkategoriach ze względu na posiadaną przez nie mnogość właściwości. Czerwony słupek świadczy o ilości genów nadeksprymowanych w linii HT29 dla danej podkategorii. Do wizualizacji wyników użyto obrazowania z użyciem programu Past v. 2.16 [22]. Diagram trójskładnikowy uzyskany w wyniku zestawienia danych przedstawia wzajemne stosunki poszczególnych genów. Przedstawia on dokładną zależność proporcji genów różniących się wobec siebie poziomem transkrypcji. Pojedyncze punkty

na diagramie oznaczają wzajemny stosunek ekspresji poszczególnych genów w trzech próbkach.

Geny, które zaznaczone zostały na wykresie jako A i B posiadają kolejno największy poziom ekspresji dla komórek HT29 inkubowanych z danymi szczepami chorobotwórczymi, natomiast AB – zbliżony poziom nadekspresji w linii HT29 dla obu próbek inkubowanych odpowiednio ze szczepami E. coli UM146 i UM147. Odpowiadają one m. in. za powodowanie apoptozy. Część zaznaczona na diagramie literą C to geny, których ekspresja była co najmniej dwukrotnie wyższa w komórkach HT29 inkubowanych ze szczepem probiotycznym,



Rysunek 1. Podkategorie terminu „Cell death” dla genów linii HT29, które uległy nadekspresji w wyniku interakcji z chorobotwórczymi bakteriami E. coli UM146 i E. coli UM14



Rysunek 2. Selekcja genów w obrębie wybranych grup genów komórek linii HT29 po 3 h inkubacji z chorobotwórczymi szczepami *E. coli* 146UM (A) oraz *E. coli* 147UM (B) i niechorobotwórczym szczepem *E. coli* Nissle 1917 (C). Czarne kropki odzwierciedlają względne proporcje pomiędzy poziomami ekspresji genów linii HT29.

znajdujące się tam geny są odpowiedzialne za wywoływanie prawidłowej odpowiedzi odpornościowej organizmu.

Podsumowanie

Nieswoiste zapalenia jelit mają skomplikowane, wieloskładnikowe podłoże, genetyczne i mikrobiologiczne. Złożenie kilku czynników predysponujących może spowodować wystąpienie objawów choroby. Defekt genetyczny warunkujący chorobę w połączeniu z infekcją bakteryjną prowadzi do nadmiernej odpowiedzi immunologicznej, utrzymywanego stałego stanu zapalnego i obumierania kolejnych warstw komórek nabłonka jelit, przez co zachwiana zostaje równowaga pomiędzy proliferacją powstających i śmiercią ginących enterocytów. Brak odpowiedniej odpowiedzi odpornościowej daje bakteriom łatwiejszy dostęp do wywoływania infekcji.

Z przeprowadzonej analizy wyników mi-

kromacierzy wynika, że chorobotwórcze bakterie *E. coli* 146UM oraz 147UM mają letalny wpływ na komórki linii HT29. Użyty wynik świadczy o istotnej roli bakterii z gatunku *E. coli* w patogenezie chorób LC i WZJG. Szczepy patogenne mają zdolność do wywoływania apoptozy, zaprogramowanej śmierci komórki, poprzez zmianę ekspresji białek w komórkach linii HT29. Wynik eksperymentu z użyciem mikromacierzy nie jest jednak jednoznaczny i trudno określić jego powtarzalność. Obserwuje się pewien rozrzut wyników, dokładniejszej analizy należałoby dokonać stosując technikę RT-PCR, która stanowi dokładniejszy wskaźnik ekspresji niż izolacja całkowitego materiału RNA z komórek. Jest to jednak metoda droga i należałoby skorzystać z niej w celu zbadania jedynie wybranych do analizy genów związanych regulacją procesu apoptozy, wytypowanych na podsta-

wie screeningu z mikromacierzy.

Należy również wziąć pod uwagę fakt, iż badania przeprowadzone były na modelu linii komórkowej, bliskiej naturalnym tkanom, jednak nie wewnątrz żywego ludzkiego organizmu. Wyniki mogą więc

świadczyć o ogólnej tendencji i być dobrym przybliżeniem rzeczywistości, jednak ostateczny wynik ekspresji białek u chorych może różnić się od danych uzyskanych eksperymentalnie.

Bibliografia:

1. DCCV (Niemieckie Stowarzyszenie Choroby Crohna i Colitis ulcerosa), tłum. E. Małecka-Panas, P. Daniel, Choroba Leśniowskiego - Crohna i inne nieswoiste zapalenia jelit, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007
2. Rampton D. S., Shanahan F., Nieswoiste zapalenia jelit, Wydawnictwo medyczne VIA MEDICA, Gdańsk 2002
3. DCCV pod red. E. Małecka-Panas, M. Słomka, Przewlekłe nieswoiste choroby zapalne jelit, MedPharm Polska, Wrocław 2012
4. Ferra B., Sprawozdanie: Badanie podłoża genetycznego nieswoistego zapalenia jelit (ang. Inflammatory Bowel Disease), 2011
5. Sechi L. A., Gazouli M., Sieswerda L. E et al., Relationship between Crohn's disease, infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and SLC11A1 gene polymorphisms in Sardinian patients, *World J Gastroenterol* 2006 Nov 28;12(44):7161-4
6. of mechanism, *Immunobiology* 2008;213(3-4):367-75
7. Selpehri S., Kotłowski R., Krause R., Khafipour E., Bernstein C., Apoptosis induced by pathogenic *Escherichia coli* as primary source of intestinal inflammation in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis
8. Blackwell J. M., Goswami T., Evans C. A et al., SLC11A1 (dormely NRAMP1) and disease resistance, *Cell Mikrobiol.* 2001 Dec;3(12):773-84.
9. Thuraisingam T., Sam H., Moisan J. et al., Delayed Cutaneous Wound Healing in Mice Lacking Solute Carrier 11a1 (Formerly Nramp1): Correlation with Decreased Expression of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor, *J Invest Dermatol*, 2006 Apr;126(4):890-901
10. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, et al., Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47, *Nat Genet*, 2011 March; 43(3): 246-252
11. DeMeo D., Silverman E., Genetic aspects of $\alpha 1$ -Antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic
12. Klionsky D. J., Codogno P., Cuervo A. M. et. al., A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes, *Autophagy* 2011 Nov;7(11):1273-94
13. Okazaki T., Wang M., Rawsthorne P. et al., Contributions of IBD5, IL23, ATG16L1 and NOD2 to Crohn's Disease Risk in a Population-Based Case-Control Study: Evidence of Gene-Gene Interactions, *Inflammatory Bowel Diseases*, volume 14 issue 11 (2008-Nov), 1528-1541
14. Billmann-Born S., Lipinski S., et al., The complex interplay of NOD-like receptors and the autophagy machinery in the pathophysiology of Crohn disease, *Eur J Cell Biol* 2011 Jun-Jul;90(6-7):593-602
15. Ramjeet M., Hussey S., Philpott D. J., Travassos L. H. 'Nodophagy' New crossroads in Crohn disease pathogenesis, *Gut Microbes* 2010 Sep;1(5):307-315
16. Muszyński J., Nieswoiste zapalenia jelit, *Przewodnik lekarza*, 6/2011; 4, 6, 22-30
17. Howard J., The IRG proteins: A function in search of modifiers of emphysema risk, *Thorax*. 2004 March; 59(3): 259-264
18. Ordas I., Mould D. R., Feagan B. G., Sandborn W. J., Anti-TNF Monoclonal Antibodies in Inflammatory Bowel Disease: Pharmacokinetics Based Dosing Paradigms, *Clin Pharmacol Ther*, 2012 Apr;91(4):635-46
19. Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W., Stokłosa T., *Immunologis*, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2007
20. Kotłowski R., Bernstein C. N., Silverberg M. S., Krause D. O., Population-Based Case-Control Study of Alpha 1-Antitrypsin and SLC11A1 in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis, *Inflamm Bowel Dis*, 2008 Aug;14(8):1112-7
21. <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>
22. Ulitsky et al., *Nature Protocols* Vol 5, pp 303 - 322, 2010
23. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

Interferencja RNA: potranskrypcyjne wyciszenie genów

Jabłońska Monika, Kołomycka Agnieszka, Orłowska Karina

Katedra Fizjologii Zwierząt

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Warmińsko – Mazurski

Olsztyn

Proces interferencji RNA (RNAi) polega na zahamowaniu ekspresji docelowego genu, przez małe niekodujące cząsteczki RNA. Zjawisko RNAi może być wywoływane przez występujące endogennie mikroRNA (miRNA) lub dostające się do organizmu na drodze naturalnej egzogenne cząsteczki RNA (materiał genetyczny wirusa, retrotranspozony). Obecnie, proces RNAi może być również celowo aktywowany w warunkach laboratoryjnych, poprzez wprowadzenie do wnętrza komórki syntetycznych cząsteczek RNA (siRNA). Niezależnie od rodzaju aktywacji, krótkie cząsteczki RNA łączą się w cytoplazmie

z kompleksem efektorowym odpowiedzialnym za degradację mRNA - RISC. Aktywny kompleks rozpoznaje komplementarną sekwencję docelowego mRNA i prowadzi do jej hydrolizy. Brak obecności transkryptu powoduje zahamowaniem translacji, tym samym przerwany zostaje przepływ informacji genetycznej w komórce. Obecnie, proces RNAi jest szeroko wykorzystywany do poznania funkcji poszczególnych genów.

Proces interferencji RNA (RNAi) polega na zahamowaniu ekspresji docelowego transkryptu przez małe, niekodujące cząsteczki RNA. Krótkie cząsteczki RNA w organizmie występują endogennie (mikroRNA) lub też dostają się do organizmu jako materiał genetyczny wirusów albo produkt transkrypcji retrotranspozonów. Proces interferencji RNA może być również aktywowany w wyniku działalności człowieka, tj. wprowadzenia syntetycznych dupleksów krótkich RNA (siRNA, ang. short interfering RNA) do wnętrza komórki [7,16].

Cząsteczki mikroRNA (miRNA) kodowane są przez genom eukariontów. Stanowią one grupę jednoniciowych fragmentów RNA o długości od 21 do 23 nukleotydów.

W komórce odpowiadają za regulację eks-

presji różnych genów, dlatego nazywane są endogennymi regulatorami ekspresji. U ludzi ekspresja ponad 1/3 genów kodujących białka zależy od mikroRNA. Dowodzi to, jak ważną rolę odgrywają te cząsteczki w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu oraz jego odpowiedzi na zmiany zachodzące w środowisku [5,6]. Do chwili obecnej odkryto ponad 35 000 miRNA (<http://www.mirbase.org>), które opisano u 223 gatunków.

Proces biogenezy miRNA można podzielić na trzy etapy, z których dwa pierwsze zachodzą w jądrze komórkowym, a trzeci w cytoplazmie. W etapie pierwszym, geny, które kodują miRNA są transkrybowane przy udziale polimerazy RNA II. W efekcie powstaje

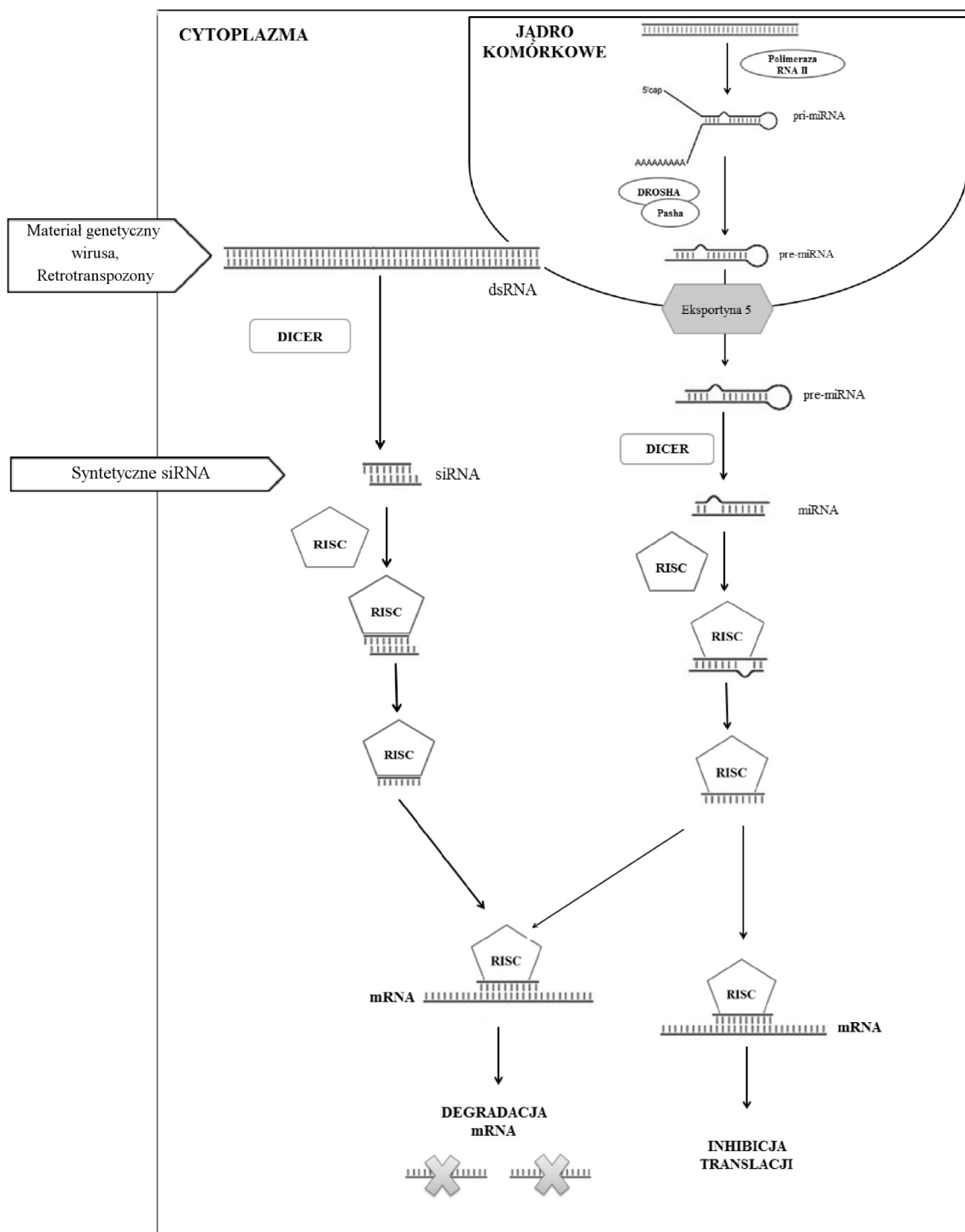
pri-miRNA będący pierwotnym transkryp-tem miRNA. Pri-miRNA składa się kilku ty-sięcy nukleotydów i ma kształt spinki do włosów. Na końcu 5' pri-miRNA znajduje się ochronna czapeczka guanylowa, a na końcu 3' ogon poli(A). W następnym eta-pie, obecny w jądrze komórkowym kom-pleks enzymatyczny Drosha (posiadający aktywność RNazy) wycina z pierwotnego transkryptu miRNA fragment o długości 70 nukleotydów. Fragment ten charakteryzuje się wewnątrzcząsteczkowymi regionami komplementarności oraz dwunukleotydo-wymi wysunięciami na końcu 3'. Struktura taka nazywana jest pre-miRNA.

W etapie trzecim pre-miRNA transporto-wane jest do cytoplazmy za pośrednictwem eksportyny 5. Znajdująca się w cytoplazmie rybonukleaza Dicer, enzym należący do ro-dziny RNaz III, tnie pre-miRNA na frag-menty RNA o długości od 18 do 24 nukleotydów. W ten sposób powstają wła-ściwe cząsteczki miRNA [3,5,6].

Następnie miRNA, dzięki aktywności biał-ka Dicer, wprowadzane jest do kompleksu efektorowego odpowiedzialnego za degra-dację mRNA - RISC (ang. RNA induced si-lencing complex). Aktywność katalityczną RISC warunkuje białko Ago-2, należące do rodziny Argonaut (Ago). W komórkach nie-posiadających białka Ago-2 nie zachodzi proces interferencji RNA. W skład białka Ago-2 wchodzi dwie charakterystyczne domeny: PAZ i PIWI. Domena PAZ wiąże obecne w komórce miRNA. Domena PIWI, o aktywności RNazy H, odpowiedzialna jest za cięcie komplementarnego mRNA [8,9,12]. Po połączeniu dwuniciowego miRNA z kompleksem RISC, nić charakte-ryzująca się bardziej stabilnym końcem 5' oddysocjuje i ulega enzymatycznej de-gradacji. Tym samym kompleks RISC staje

się aktywny. Nić, która pozostała w kom-pleksie RISC (nić wiodąca) hybrydyzuje z komplementarnym mRNA. W przypadku gdy sekwencja miRNA i mRNA jest homo-logiczna w 100%, białko Ago-2 w obecności jonów magnezu, rozrywa wiązanie fosfora-nowe dokładnie pomiędzy 10. a 11. nukle-otydem mRNA, licząc od końca 5' nici miRNA. Następnie, kompleks oddysocjo-wuje w celu znalezienia kolejnego komple-mentarnego mRNA. Pocięte mRNA nie posiada ochronnej czapeczki 7-metylogu-aninowej i ogona poli-A, tym samym nara-żone jest na działanie występujących w komórce RNaz. Brak mRNA doprowadza do zahamowania translacji, co prowadzi do przzerwania przepływu informacji gene-tycznej w komórce. W sytuacji gdy se-kwencje miRNA i mRNA nie są stuprocentowo komplementarne, kompleks RISC-miRNA hybrydyzuje do mRNA bloku-jąc translację, tym samym transkrypt nie zostaje zniszczony. Dzięki temu, przy nagłej zmianie warunków środowiskowych, moż-liwe jest szybkie wznowienie translacji [3, 4, 5, 6].

Zjawisko interefencji RNA może być także wywoływane przez długie dwuniciowe czą-steczki RNA (dsRNA, ang. double-strand RNA), będące materiałem genetycznym wirusa lub też produktem transkrypcji re-trotranspozonów [3]. Obecne w komórce egzogenne RNA aktywuje rybonukleazę Dicer. Enzym ten tnie obce RNA do krót-kich interferujących RNA (siRNA) - czą-steczek o długości od 20 do 25 nukleotydów. Cząsteczki siRNA charakte-ryzują się obecnością dwóch niesparowa-nych nukleotydów na końcu 3' oraz grupą fosforanową na końcu 5'. Przy udziale białka Dicer, siRNA wprowadzane są do kompleksu efektorowego RISC. Dalej, pro-



Rysunek 1. Molekularny mechanizm interferencji RNA

ces interferencji RNA indukowany obecnością egzogennych kwasów nukleinowych przebiega tak jak w przypadku miRNA. Warto jednak zaznaczyć, że w wyniku wyciszenia genów przy udziale siRNA zawsze dochodzi do degradacji docelowego mRNA [2,7,8,10].

Niezależnie od opisanych powyżej zjawisk, które występują w przyrodzie, interferencja RNA może być celowo wykorzystywana przez człowieka w warunkach laboratoryjnych poprzez wprowadzenie do wnętrza komórki syntetycznych cząsteczek RNA (siRNA). Stało się to możliwe dzięki odkryciu dwójki naukowców A. Fire oraz C.C Mello, którzy w roku 1998 na łamach „Nature” opublikowali wyniki swoich wieloletnich badań, przeprowadzonych na nicieniu *Caenorhabditis elegans*. Wynikało z nich, że wprowadzenie syntetycznych siRNA do komórek zwierzęcia prowadzi do ukierunkowanej degradacji komplementarnego transkryptu.

Proces interferencji RNA aktywowany w wyniku pojawienia się w komórce syntetycznych siRNA przebiega w ten sam sposób jak dla miRNA. Obecne w cytoplazmie siRNA łączy się z RISC, a następnie hybrydyzuje do komplementarnego mRNA. Homologiczne mRNA jest rozkładane przez białko Ago-2, w efekcie czego zatrzymany zostaje proces translacji i nie powstaje docelowe białko [9]. Syntetyczna cząsteczka siRNA powinna hamować ekspresję homologicznego genu i tym samym nie wywoływać efektów niespecyficznych. Cząsteczki siRNA projektuje się wg następujących kryteriów:

- długość od 21 do 23 nt,
- homologia tylko do docelowego mRNA,
- sekwencja docelowa, dla której projektowane jest siRNA, musi znajdować się

w odległości 50-100 nukleotydów od miejsca inicjacji translacji,

- na końcu 3' każdej z nici powinny występować dwa niesparowane nukleotydy,
- zawartość par G-C w siRNA powinna wynosić od 30 - 50%,
- powinno się unikać sekwencji bogatych w guaninę,
- temperatura topnienia konstruktów powinna być możliwie najniższa,
- należy unikać długich powtórzeń jednego nukleotydu.

Obecnie dostępne są różne programy komputerowe, które wykorzystując powyższe kryteria, projektują potencjalnie najbardziej efektywne cząsteczki siRNA. Należą do nich m.in. siDESIGN Center Designer czy Block-iT RNAi [1, 9, 10, 12, 13]. Standardowo, jednorazowo projektuje się 3-5 siRNA o różnych sekwencjach. Niekiedy, aby uzyskać efekt wyciszenia genu, konieczne jest zaprojektowanie i sprawdzenie nawet 20 różnych sekwencji siRNA. Aktualnie siRNA otrzymuje się głównie na drodze syntezy chemicznej. Metoda ta pozwala na pełną kontrolę sekwencji i struktury utrzymywanych związków [14].

Cząsteczki siRNA wprowadzane są do cytoplazmy komórek za pomocą różnych metod transfekcyjnych. Najczęściej do wyciszenia genów w warunkach in vitro stosuje się liposomy i polimery. Są to komercyjnie dostępne kationowe nośniki siRNA, pozwalające na przezwycięzenie odpychania elektrostatycznego występującego pomiędzy ujemnie naładowaną błoną komórkową a ujemnie naładowanym siRNA. Ponadto, w porównaniu do innych metod, zastosowanie kationowych nośników siRNA jest proste i tanie. Inne metody to m.in. wektory wirusowe, elektroporacja

czy iniekcja [10, 14, 15]. Odkrycie, że proces RNAi może być celowo aktywowany w warunkach laboratoryjnych pozwoliło na wykorzystanie tego zjawiska w pracach doświadczalnych. Obecnie, wyciszenie ge-

nów metodą interferencji RNA jest szeroko stosowane w badaniach w zakresie biologii molekularnej i medycyny [7, 15].

Bibliografia:

1. Cejka D., Losert D., Wacheck V. 2006. Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? *Clinical Science*, 110: 47-58
2. Chromik I. 2008. Zastosowanie interferencji RNA (RNAi) w raku trzustki-nowe strategie leczenia. *Gastroenterologia Polska*, 15: 337-342
3. Dykxhoorn D., Lieberman J. 2005. The Silent Revolution: RNA Interferences as Basic Biology, Research Tool, and Therapeutic. *AR Reviews in Advance*, 56: 401-423
4. Filip A. 2006. Mikro-RNA - Małe cząsteczki o wielkim znaczeniu. *Postępy Biologii Komórki*, 1: 45-57
5. Grenda A., Budzyński M. 2013. Biogeneza cząsteczek mikroRNA oraz ich znaczenie w powstawaniu i przebiegu wybranych zaburzeń hematologicznych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67: 174-185
6. Hukowska-Szematowicz B., Deptuła W. 2010. Biologiczna rola mikroRNA - nowe dane. *Postępy Biologii Komórki*, 3: 585-597
7. Jabłońska M. 2014. Prace pilotowe nad wyciszeniem genu receptora węglowodorów aromatycznych (AhR) w komórkach ziarnistych linii AVG-16 za pomocą krótkich, interferujących RNA (siRNA). Mskr. Pracy magisterskiej. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn, ss.
8. Jóźwiak P., Lipińska A. 2010. Zastosowanie interferencji RNA w diagnostyce i terapii niektórych chorób człowieka. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 64: 504-512
9. Leung R., Whittaker P. 2005. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 107: 222-239
10. Matokanović M., Barišić K. 2009. RNA Inteference as New Tool in Therapeutics. *Food Technology and Biotechnology*, 47: 229-235
11. Piotrowska A., Rybarczyk A., Wierzbicki P., Kotwas M., Wrońska A., Kmiec Z. 2009. Interferencja RNA - Mechanizmy i Możliwości Terapeutycznego Wykorzystania. *Polish Annals of Medicine*, 16: 138-147
12. Potapińska O., Wąsik M. 2009. Wyciszenie nadekspresji genu MDR1 za pomocą siRNA: nośniki, efekty, perspektywy. *Jurnal of Oncology*, 1: 33-39
13. Sierant M., Kazmierczak-Baranska J., Paduszynska A., Sobczak M., Pietkiewicz A., Nawrot B. 2010. Longer 19-base pair short interfering RNA duplexes rather than shorter duplexes trigger RNA interference. *Oligonucleotides*, 20: 199-206
14. Sipa K., Nawrot B. 2008. Mechanizm interferencji RNA i wykorzystanie RNAi dla celów terapeutycznych. *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii*, 1: 7-18
15. Stanisławska J., Olszewski W. L. 2005. RNA interference - significance and applications. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 53: 39-46
16. Szweykowska - Kuklińska Z., Szarzyńska B. 2007. Nagroda Nobla 2006 za fundamentalne odkrycia w regulacji ekspresji genów u eukariontów. *Postępy Biologii Komórki*, 1: 3-13

Innowacyjne technologie manipulacji płcią ryby

Agnieszka Sikora, Krystyna Demska-Zakęś

Katedra Ichtiologii

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

Olsztyn

Obecnie istotnym czynnikiem wpływającym na rozwój akwakultury, zarówno w Polsce, jak i na świecie jest wzrost zapotrzebowania na mięso ryb i materiał zarybieniowy (ochrona bioróżnorodności). W celu zwiększenia podaży produktów rybnych sukcesywnie wzrasta odsetek ryb pochodzących z chowu i hodowli w intensywnych systemach produkcyjnych, często w oparciu o innowacyjne technologie. W ostatnich latach w wielu krajach, w tym i w Polsce odnotowuje się duże zainteresowanie technologiami produkcji jednopłciowych lub sterylnych stad ryb. Zastosowanie tych technologii pozwala m.in. na zredukowanie zachowań agresywnych, obniżenie współczynników pasz, zwiększenie tempa wzrostu i przeżywalności ryb, poprawę jakości mięsa, czy też zwiększenie wydajności rzeźnej.

Podstawą do projektowania technologii produkcji jednopłciowych lub sterylnych stad ryb jest znajomość mechanizmów determinacji i dyferencjacji płci ryb, procesu gametogenezy i embriogenezy oraz zasad i technik przeprowadzania manipulacji genetycznych i/lub farmakologicznych. Generalnie, nie jest to zadanie proste, gdyż u ryb występują znaczne różnice gatunkowe m.in. w przebiegu determinacji i dyferencjacji płci, a kształtowanie i rozwój układu rozrodczego uwarunkowane są przez kompleks czynników wewnętrznych i zewnętrznych. Bezpośrednio ukierunkowane zmiany płci ryb można przeprowadzić wykonując takie zabiegi jak: gynogeneza, androgenesa, poliploidyzacja czy hybrydyzacja. Ze względu na stosunkowo wysokie koszty i niską efektywność większości ww. procedur, w praktyce lepszym rozwiązaniem jest wyprodukowanie tarlaków (neosamców lub neosamic) o specyficznych cechach (metoda pośrednia). W akwakulturze ryb łososiowatych głównym elementem technologii produkcji jednopłciowych samich stad ryb jest wytworzenie neosamców - osobników o genotypie samicy i funkcjonalnym samczym układzie rozrodczym. Takie ryby można uzyskać przeprowadzając najpierw zabieg gynogenezy, a następnie dokonując farmakologicznej maskulinizacji.

Wstęp

W akwakulturze coraz większą rolę odgrywają technologie wykorzystujące najnowszą wiedzę oraz osiągnięcia techniczne (Donaldson 1996). Szczególnie w ostatnich latach wzrasta zainteresowanie hodowców technologiami chowu i hodowli ryb w stadach jednopłciowych (częściej samich,

rzadziej samych) lub sterylnych (ryby triploidalne), co związane jest z obniżeniem nakładów finansowych produkcji oraz zwiększeniem zysków (Piferrer 2001). Zastosowanie tych technologii pozwala bowiem m.in. na zredukowanie zachowań agresywnych, obniżenie współczynników

pasz, zwiększenie tempa wzrostu i przeżywalności ryb, poprawę jakości mięsa, czy też zwiększenie wydajności rzeźnej. Ukie-
runkowane zmiany płci ryb można przepro-
wadzić stosując preparaty farmakologiczne
lub wykonując takie zabiegi jak: gynogene-
za, androgeniza, poliploidyzacja, czy hy-
brydizacja (Ihssen i in. 1990). Podstawą do
projektowania technologii produkcji jedno-
płciowych lub sterylnych stad ryb jest zna-
jomość mechanizmów determinacji
i dyferencjacji płci ryb, procesu gametoge-
nezy i embriogenezy oraz zasad i technik
przeprowadzania manipulacji genetycznych
i/lub farmakologicznych.

Większość ryb są to zwierzęta rozdzielno-
ciowe, co oznacza, że dojrzałe samce pro-
dukuja plemniki, a samice wytwarzają
wyłącznie komórki jajowe. Wiele gatunków
ryb nie posiada narządów umożliwiających
wprowadzenie plemników do dróg rodnych
samicy, więc występuje u nich zjawisko za-
płodnienia zewnętrznego. Komórki rozrod-
cze wydalone są bezpośrednio do wody,
w której dochodzi do połączenia gamet mę-
skich i żeńskich. Warunkiem, jaki musi być
spełniony aby doszło do skutecznego za-
plemnienia, musi być zbliżenie samic i sam-
ców biorących udział w tarle oraz
jednoczesne uwolnienie komórek rozrod-
czych. Hermafrodytyzm, czyli wytwarzanie
przez jeden organizm jaj i plemników, u ryb
występuje bardzo rzadko (Bieniarz i Epler
1991).

Mimo że strategie tworzenia produktów
płciowych oraz tarła mogą być różne w za-
leżności od gatunku ryb, większość wyka-
zuje cechy wspólne w działaniach
prowadzących do powstania dojrzałych ga-
met. Oogeneza jest procesem powstawania
komórek jajowych z pierwotnej komórki
płciowej. W wyniku licznych podziałów mi-

totycznych z pierwotnych komórek płcio-
wych powstają gonocyty, a następnie oogo-
nie. Komórki oogonialne różnicują się
w oocyty I rzędu. W wyniku następujących
po sobie podziałów redukcyjnego i ekwacyj-
nego powstaje komórka jajowa i ciało kie-
runkowe. U ryb podczas oogenezy proces
mejozy nie zachodzi w sposób ciągły. Pierw-
szy podział mejotyczny zostaje zablokowany
już w profazie I podziału mejotycznego.
Podczas bloku diplotenowego oocyt rozwija
się i rośnie, przechodząc proces prewitello-
genezy i witellogenezy (Demska-Zakęś
1994). Po zgromadzeniu odpowiedniej ilości
żółtka następują dalsze etapy pierwszego
podziału mejotycznego. W ich konsekwencji
powstają dwie komórki: większa oocyt II
rzędu oraz mniejsza I ciało kierunkowe.
Oocyt II rzędu przekształcany jest w komór-
kę jajową w wyniku drugiego podziału mejo-
tycznego. Podczas tego procesu mejoza jest
ponownie hamowana. Komórki jajowe uwal-
niane przez samicę do środowiska wodnego
w trakcie tarła znajdują się w stadium meta-
fazy drugiego podziału mejotycznego. W tym
stadium następuje zaplemnienie i pobudze-
nie komórki do dokończenia podziału ekwa-
cyjnego. Po podziale i wyrzuceniu II ciała
kierunkowego dochodzi do kariogamii
(Demska-Zakęś 1994).

Determinacja i dyferencjacja płci u ryb

Wiele gatunków ryb używa systemów gene-
tycznych, które determinują płeć podczas
zapłodnienia, niektóre korzystają z we-
wnętrznych wskazówek dostarczanych po-
przez oddziaływania behawioralne u tego
samego gatunku, podczas gdy inne wyko-
rzystują zmienne czynniki środowiskowe,
takie jak temperatura (Baroiller i in. 1999,
Baroiller i D'Cotta 2001).

Geny mogą stać się dominującym czynni-
kiem w kształtowaniu kierunku determinacji

płci tak, że czynniki środowiskowe mają niewielki wpływ. Niektóre geny mogą kierować rozwojem jajników, a inne rozwojem jąder. Płeć konkretnego osobnika będzie określana przez siłę czynników genetycznych otrzymanych z rodziców (Devlin i Nagahama 2002). Ryby są najbardziej zróżnicowaną grupą kręgowców pod względem typów chromosomowych systemów determinacji płci (Solari 1994). Wyróżnia się 9 systemów chromosomowej determinacji płci. Równorzędnie z badaniami nad identyfikacją chromosomów płci ryb prowadzone są eksperymenty polegające na zidentyfikowaniu genów determinujących płeć. Molekularne badania chromosomu Y u ssaków pozwoliły wyizolować fragment DNA dla niego specyficzny, a gen ten nazwano SRY (ang. Sex Determining Region Y Gene). Obecność fragmentu tego genu powoduje przekształcenie gonady pierwotnej w męską (Koopman i in. 1991). Niestety wiedza na temat genów, które determinują płeć u ryb, jest wciąż niewielka. W celu uzyskania odpowiedzi, które z genów mają wpływ na determinację płci, prowadzi się badania z użyciem organizmów modelowych. U ryb jednym z organizmów wykorzystywanym w badaniach genetycznych jest medaka (*Oryzias latipes*). Badania wykazały, iż fragment DNA, który determinuje płeć samczą u medaki, jest gen *dmrt1bY* (Kondo i in. 2003).

Zdeterminowana płeć realizuje się podczas procesu dyferencjacji. Jest to proces, zachodzący w różnym okresie życia ryb (nawet kilka-kilkanaście miesięcy po wykluciu), w którym dochodzi do różnicowania się gonad (dyferencjacja anatomiczna) oraz różnicowania się pierwotnych komórek płciowych w oogonia lub spermatogonia (dyferencjacja cytologiczna) (Demska-Zakęś

1995, Devlin i Nagahama 2002). W procesie tym kluczową rolę pełnią hormony steroidowe: androgeny i estrogeny, niezbędne do prawidłowego rozwoju samców i samic. Prekursorem hormonów steroidowych jest cholesterol, który przekształcany jest w hormony steroidowe w szlaku metabolicznym, w którym udział biorą monooksygenazy P-450 (Berg i in. 2007). Istotnym etapem rozwoju gonad jest przekształcenie testosteronu do 17β estradiolu. Konwersja ta jest katalizowana przez aromatazę testosteronu. Aromataza jest enzymem należącym do kompleksu cytochromu P450 i składa się z dwóch różnych białek kodowanych przez gen *Cyp 19*. Gen *Cyp 19a1a* ma miejsce ekspresji w retikulum endoplazmatycznym gładkim komórek steroidotwórczych i często określany jest jako „gen gonadalny” (Simpson i in. 1994). Proces dyferencjacji gonad jest bardzo niestabilny i może zostać zakłócony poprzez egzogenne hormony lub związki chemiczne znajdujące się w wodzie (Demska-Zakęś 2005).

Technologie manipulacji płcią ryb **Manipulacje farmakologiczne**

W celu otrzymania jednopłciowych stad ryb w okresie dyferencjacji gonad stosuje się egzogenne hormony steroidowe. Bezpośrednio (w pierwszym pokoleniu) ukierunkowany rozwój płci gonadowej można osiągnąć podając rybom odpowiednie dawki (bardzo różne dla różnych gatunków ryb) egzogennych estrogenów lub androgenów. W zależności od czasu i tempa różnicowania gonad hormony aplikuje się w imersji i/lub w pokarmie. Można również zastosować implanty dootrzewnowe lub iniekcje. Najczęściej stosowanym hormonem do indukcji rozwoju płci żeńskiej jest 17β -estradiol (Devlin i Nagahama 2002). Natomiast maskulinizację ryb przeprowadza się podając

17 α -metylotestosteron lub 11 β - hydroksyandrostendion. Obecnie steroidy znacznie częściej wykorzystywane są do produkcji stad jednopłciowych w drugim pokoleniu (tzw. metoda pośrednia). Ta technologia jest z powodzeniem stosowana w akwakulturze ryb łososiowatych m.in. pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). Samice stada tego gatunku można uzyskać poprzez wykorzystanie do zapłodnienia ikry nasienia pochodzącego od neosamców (ryb o genotypie XX z męskim układem rozrodczym). W tym celu przeprowadza się maskulinizację ryb przy użyciu 11 β - hydroksyandrostendionu lub 17 α -metylotestosteronu. Po osiągnięciu dojrzałości płciowej od wyselekcjonowanych (np. metodami cytogenetycznymi) neosamców pobiera się nasienie, które wykorzystywane jest do zapłodnienia ikry normalnych samic (Demska-Zakęś i in. 2005). Selekcja samców o genotypie XX nie jest konieczna, jeżeli maskulinizacja przeprowadzona zostanie na pstrągach poddanych wcześniej zabiegowi gynogenezy (patrz: kolejny podrozdział niniejszej pracy).

Metoda inwersji płci przy użyciu androgenów jest dość skuteczna, aczkolwiek ma swoje wady. Po zastosowaniu egzogennych hormonów, zwłaszcza 17 α -metylotestosteronu, może dojść do zaburzeń rozwoju i funkcjonowania gonad. Jądra mogą charakteryzować się nietypowym kształtem lub wielkością. Może wykształcić się tylko jedno jądro lub może dojść do sytuacji, że nie wykształcą się nasieniowody lub będą one niedrożne (Hliwa i in. 2011). W celu uzyskania nasienia od takich neosamców należy uśmiercić osobniki, a gonady poddać maceracji. Dodatkowo, pozyskany mlecz może zawierać małą ilość ruchliwych plemników, co poniekąd może wpływać na ilość zapłodnionej ikry (Robles i in. 2003). Z tego

względu w ostatnich latach prowadzone są prace nad opracowaniem alternatywnych technologii produkcji neosamców, np. z zastosowaniem preparatów farmakologicznych zawierających inhibitor aromatazy testosteronu. Aromataza występuje w mięśniach, wątrobie, tkance tłuszczowej i przekształca androstendion oraz testosteron do estradiolu (Mokbel 2002). Na rynku występuje wiele leków, które hamują aktywność aromatazy testosteronu. W zależności od sposobu działania można podzielić je na dwie grupy: kompetencyjne inhibitory aromatazy i samobójcze. Pierwsze z nich działają poprzez blokowanie miejsca katalitycznego w sposób odwracalny. Samobójcze inhibitory także blokują miejsce katalityczne enzymu, jednak w sposób nieodwracalny (Brueggemeier i in. 2005). Według klasyfikacji opierającej się na czasie udostępniania i badaniach klinicznych inhibitory, aromatazy można podzielić na trzy generacje. Farmaceutyki należące do pierwszej generacji są lekami o szerokim spektrum działania. Druga generacja leków działa bardziej wybiórczo, a leki należące do trzeciej generacji reagują wyłącznie z aromatazą testosteronu (Potemski i Płużyńska 1998). Do farmaceutyków zaliczanych do grupy inhibitorów aromatazy należy np. fadrozol. Podawanie fadrozolu tilapii nilowej (*Oreochromis niloticus*) w paszy powoduje zwiększony odsetek samców w stosunku do kontroli (Eleraky i in. 2011). Co istotne, ryby te mają w pełni funkcjonalny układ rozrodczy.

Manipulacje genetyczne

Gynogeneza

Indukcja gynogenezy jest jedną z metod uzyskiwania populacji samiczych. Proces ten zachodzi naturalnie u niektórych gatunków niciani, owadów, ryb (np. u ryb kozo-

watych (*Cobitidae*)) lub niektórych karpio-
watych np. karasia chińskiego (*Carassius*
auratus) i płazów (Kiester i in. 1981, Devlin
i Nagahama 2002).

Sztuczna gynogeneza jest procesem, który
pozwala przekazać potomstwu materiał ge-
netyczny pochodzący tylko od matki, a do-
datkowo uzyskać jednopłciowe samicze
stado ryb (jeżeli zabieg ten jest przeprowa-
dzany na gatunkach ryb o systemie deter-
minacji płci XY lub pokrewnych, jak to ma
miejsce np. u pstrąga tęczowego). Zabieg
indukcji gynogenezy można przeprowadzić
zaburzając proces mejozy (gynogeneza me-
jotyczna) lub mitozy (gynogeneza mitotycz-
na). Zaburzenia podziału zaplemnionej
komórki jajowej lub zygoty dokonuje się
wykonując udar środowiskowy (szok) ter-
miczny albo ciśnieniowy. Szok termiczny
zazwyczaj polega na zanurzeniu zaplemnio-
nych jaj lub zygot albo w zimnej (w przy-
padku gatunków ciepłolubnych), albo
cieplej wodzie (w przypadku gatunków zim-
nolubnych). Natomiast podczas stosowania
udaru ciśnieniowego komórki umieszcza się
w komorze wytwarzającej wysokie ciśnie-
nie. Zastosowanie szoku ciśnieniowego jest
najlepszą, aczkolwiek kosztowną metodą
indukcji gynogenezy (Pandian i Koteeswa-
ran 1998). Parametry szoku oraz czas jego
działania decydują o efektach zabiegu i mu-
szą one zostać wyznaczone eksperymental-
nie dla każdego gatunku ryb (Jankun i in.
2008). W warunkach laboratoryjnych do
przeprowadzenia udaru można wykorzystać
substancje chemiczne np. cytochalazynę B
lub kolchicynę (Pandian i Koteeswaran
1998).

Gynogeneza mejotyczna to proces, w któ-
rym diploidalne organizmy gynogenetyczne
powstają w wyniku zatrzymania II ciała
kierunkowego, dzięki czemu nie dochodzi

do zredukowania materiału genetycznego
oocyta. Materiał genetyczny pochodzący od
ojca nie jest przekazywany; plemnik służy
tylko do pobudzenia komórki jajowej. Dez-
aktywacja materiału genetycznego plemni-
ka następuje w wyniku promieniowania UV,
rzadziej promieniowania jonizującego.
Dawkę i czas naświetlenia należy dobrać
tak, aby doszło do całkowitego zniszczenia
DNA bez uszkodzenia aparatu ruchowego
plemnika (Jankun i in. 2008). Zaplemnioną
takim plemnikiem komórkę jajową należy
podać szokowi środowiskowemu w celu za-
trzymania II ciała kierunkowego. W wyniku
działania udaru powstaje zygota ($2n$) z wy-
łączenie żeńskim materiałem genetycznym
(gynogenetyczna heterozygota) (Ihssen i in.
1990).

W gynogenezie mitotycznej diploidalne or-
ganizmy indukowane są w wyniku zatrzyma-
nia pierwszego podziału mitotycznego
zygoty. Materiał genetyczny ojca jest tak sa-
mo jak w przypadku gynogenezy mejotycznej
dezaktywowany, a plemnik służy tylko do po-
budzenia komórki jajowej. Tuż przed rozpo-
częciem bruzdkowania stosuje się szok
w celu zniszczenia wrzeczona kariokinetycz-
nego i podwojenia ilości materiału gene-
tycznego do $2n$. W tym przypadku
powstające organizmy są gynogenetycznymi
homozygotami (Jankun i in. 2008).

Sztuczne wywoływanie gynogenezy, zwłasz-
cza mitotycznej, może prowadzić do powsta-
nia wad rozwojowych u potomstwa.
W wyniku źle przeprowadzonej procedury
niszczenia DNA plemnika lub przeprowa-
dzenia zbyt późno udaru środowiskowego,
może powstać potomstwo z mozaicyzmem
komórkowym. Jest to choroba, która powo-
duje występowanie komórek o różnej plo-
idalności u jednego osobnika (Lin i in.
2001).

Androgeneza

Celem androgenезy jest otrzymanie osobników u których cały jądrowy materiał genetyczny będzie pochodził od ojca. Androgeneza jest trudniejszym do wykonania zabiegiem, niż gynogeneza. Wiąże się to z koniecznością dezaktywacji DNA komórki o stosunkowo dużych rozmiarach bez naruszenia/uszkodzenia mitochondrialnego DNA i żółtka (materiału odżywczego dla embriónów i larw). Podczas procesu androgenезy diploidalne organizmy produkowane są poprzez zatrzymanie I podziału mitotycznego komórki, czyli homozygoty eksponowane są na działanie późnego szoku środowiskowego. Jądrowy materiał genetyczny pochodzący od matki jest dezaktywowany za pomocą promieniowania jonizującego (zwłaszcza gamma) lub UV. Następnie tak inaktywowane oocyty zaplemniane są normalnymi plemnikami i poddawane udarowi środowiskowemu. Podobnie, jak w przypadku gynogenezy, stosuje się szok termiczny lub ciśnieniowy. W wyniku androgenезy można uzyskać stado wyłącznie samcze (u gatunków z system determinacji płci WZ lub pokrewnym) lub, jak w przypadku pstrąga tęczowego, stado mieszane o genotypie XX (samice) lub YY (supersamce) (Kucharczyk 2002).

Proces androgenезy ze względu na niską przeżywalność materiału (kilka %) nie ma obecnie znaczenia komercyjnego. Natomiast w powiązaniu technologią kriokonserwacji nasienia jest jedną z technik ochrony populacji i stad ryb (Komen i Thorgaard 2007).

Poliploidyzacja

Komórki somatyczne, które posiadają jądro, wyposażone są w charakterystyczną dla danego gatunku liczbę chromosomów tworzących kariotyp. Większość ryb to organizmy

diploidalne, co oznacza, że mają one dwa komplety chromosomów - jeden z tych zestawów pochodzi od matki, drugi natomiast odziedziczony został po ojcu (Boroń 2001). Należy jednak podkreślić, że wśród ryb są też gatunki poliploidalne (Juchno 2004). Występowanie takich ryb w środowisku naturalnym stało się przesłanką do opracowania technologii produkcji poliploidów.

Inżynieria genetyczna ryb rozpoczęła się właśnie od technik tri- i tetraploidyzacji, ze względu na to, iż hodowcy ryb byli zainteresowani pozyskiwaniem i hodowlą bezpłodnych poliploidalnych osobników. Ryby triploidalne mogą szybciej rosnąć, ponieważ nie wykorzystują energii z pokarmu na rozwój gonad i komórek rozrodczych. Hodowla ryb, które są bezpłodne, wyeliminowuje problemy związane z dojrzewaniem płciowym, takie jak: obniżenie jakości mięsa, spadek tempa wzrostu, zwiększona śmiertelność (Dobosz i in. 1995).

Triploidalne osobniki otrzymywane są w wyniku zatrzymania procesu mejozy poprzez działanie udaru środowiskowego na zaplemnione jaja. Gdy plemnik wnika do oocytu, jądro tego oocytu dzieli się i wytwarza haploidalne jądro oocytu oraz drugie ciało kierunkowe. Jeżeli w tym czasie zaplemniony oocyt zostanie poddany szokowi środowiskowemu, to wyrzucenie drugiego ciała kierunkowego z komórki zostanie zatrzymane. W ten sposób w zapłodnionym jaju znajdują się trzy haploidalne genomy: jądro jaja, jądro drugiego ciała kierunkowego (materiał genetyczny od matki) oraz jądro plemnika (materiał genetyczny od ojca). W kolejnym etapie następuje połączenie się tych trzech jąder i powstaje triploidalna zygota ($3n$), która nazywana jest zygotą autotriploidalną. Organizm triploidalny można również otrzymać poprzez skrzyżowanie

osobnika diploidalnego (plemnik) z tetraploidalnym (komórka jajowa) (Boroń 2001). Tetraploidy są to organizmy, które powstają, gdy zatrzymany zostanie pierwszy podział mitotyczny diploidalnej zygoty. Podczas końcowej fazy mitozy, przed podziałem komórki zygoty na dwie komórki potomne, wszystkie chromosomy ulegają procesowi replikacji, ploidalność zmienia się z $2n$ do $4n$. Gdy poprzez zastosowanie udaru zostanie przerwane dokończenie pierwszego podziału zygoty, zarodek zostanie w stanie jednokomórkowym, a dwa diploidalne jądra złączą się i stworzą jądro tetraploidalne ($4n$) (Kuciński i Jankun 2008).

Hybrydyzacja

Hybrydyzacja jest procesem, w którym z komórek o odmiennym genotypie, różniących się pewnymi cechami genetycznymi, powstaje organizm potomny nazywany mieszańcem lub hybrydą (Dowling i Secor 1997). U ryb, częściej niż u innych kręgowców, obserwuje się występowanie organizmów powstałych na drodze hybrydyzacji. Jest to związane z zapłodnieniem zewnętrznym oraz specyfiką środowiska życia. W warunkach kontrolowanych hybrydyzacja np. ryb łososiowatych jest łatwa w realizacji. Natomiast w warunkach naturalnych międzygatunkowe krzyżówki np. łosia (*Salmo salar*) i troci (*Salmo trutta*) pojawiają się bardzo rzadko, dzięki obecności mechanizmów izolacyjnych związanych głównie z rozdzieleniem miejsc tarłowych (Garcia de Léaniz i Verspoor 1989).

Duże znaczenie w procesie hybrydyzacji ma zjawisko heterozji, która jest wynikiem uzupełnienia korzystnych genów pochodzących od rodziców, co np. może prowadzić do szybszego wzrostu organizmów (Cowx 1983). Korzystną cechą hybryd jest często większa odporność na choroby, czy toleran-

cja na zmniejszoną zawartość tlenu w wodzie (Schlosser i in. 1998).

Poprzez hybrydyzację można otrzymywać jedнопłciowe stada ryb. W tym celu do krzyżowania wybiera się gatunki spokrewnione o odmiennych systemach determinacji płci, tj. WZ i XY. Takie zróżnicowanie występuje np. u tilapii. Przykładowo, tilapia nilowa (*Oreochromis niloticus*) ma system determinacji płci XY, natomiast spokrewniona z nią tilapia czerwona (*O. aureus*) ma system WZ (Wohlfarth i in. 1990). Krzyżując samice tilapii nilowej (XX) z samcami tilapii czerwonej uzyskuje się samcze stado hybryd tych gatunków. Jest to korzystne, gdyż takie tilapie cechuje szybki wzrost, szeroka tolerancja względem rodzaju pasz oraz jakości wody, większa odporność na choroby, dobra jakość mięsa, wysoka wydajność rzeźna (Wohlfarth i in. 1990).

Podsumowanie

W akwakulturze coraz większym zainteresowaniem cieszą się technologie produkcji jedнопłciowych stad ryb. Podstawy technologii produkcji stad jedнопłciowych gatunków ryb zostały opracowane, jednak uzyskiwane efekty nie zawsze są satysfakcjonujące. Dlatego też ten obszar badań nadal się rozwija. Innowacyjne technologie manipulacji płcią ryb cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na możliwość otrzymywania stad jedнопłciowych lub sterylnych, a co za tym idzie, osobników o szybszym tempie wzrostu, lepszej jakości mięsa, większej odporności na choroby.

Jedną ze skutecznych metod kontrolowania płci ryb są zabiegi manipulacji genetycznych nazywane technikami inżynierii genomowej. Techniki te polegają na indukcji rozwoju zarodków z udziałem tylko samczego lub tylko samczego genomu jądrowego oraz na tworzeniu zarodków

poliploidalnych. Stada samicze uzyskuje się w wyniku ginogenezy, natomiast w wyniku androgenozy uzyskuje się stada samcze. Poiliploidyacja polega na tworzeniu organizmów, które posiadają więcej niż dwa zestawy chromosomów. Organizmy triploidalne charakteryzują się całkowitą sterylnością, przez co tempo wzrostu nie ulega spowolnieniu, a jakość mięsa jest wysoka. Hybrydyzacja stała się jedną z metod biotechnologicznych poprzez które otrzymuje się populacje o większej tolerancji na zimno, zasolenie, stężenie amoniaku oraz o szybszym tempie wzrostu i wyższej odporności na choroby.

Do manipulacji płcią ryb oprócz technik inżynierii genetycznej wykorzystuje się również farmaceutyki. Badania nad hormonami

steroidowymi i ich wpływie na układ rozrodczy ryb nadal trwają. Eksperymenty tego typu mają na celu wykazanie jak farmaceutyki wpływają na układ płciowy i dokrewny organizmów wodnych oraz poszukiwanie i testowanie nowych preparatów pod kątem wykorzystania ich do inwersji płci. Stosowanie środków hormonalnych do zmiany płci podczas tarła budzi wiele kontrowersji. Alternatywą stosowania hormonów jest użycie środków farmakologicznych, które zawierają inhibitor aromatazy testosteronu blokujący biosyntezę estradiolu z testosteronu. Dzięki temu poziom androgenów w organizmie wzrośnie i rozwinię się męski układ płciowy u ryb o genotypie XX, a w następnym pokoleniu będzie można wyhodować populację samiczą.

Bibliografia:

1. Baroiller J. F., D'Cotta H. D., 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130C: 399-409
2. Baroiller J. F., Guiguen Y., Fostier A., 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 910-931.
3. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L., 2007. *Biochemia*. Wydawnictwo PWN, Warszawa, s. 734-760.
4. Bieniarz K., Epler P., 1991. *Rozród ryb*. LETRA, Kraków.
5. Boroń A., 2001. Koza (*Cobitis taenia* Linnaeus, 1758) - co naprawdę chronimy? Metody cytogenetyczne jako narzędzie rozpoznawania niektórych gatunków ryb. *Roczniki Naukowe PZW*, 14, Supl.: 339-351.
6. Brueggemeier R. W., Hackett J. C., Diaz-Cruz E. S., 2005. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocrine Reviews* 26(3): 331-345.
7. Cowx I.G., 1983. The biology of bream *Abramis brama* (L), and its natural hybrid with roach, *Rutilus rutilus* (L) in the River Exe. *J. Fish. Biol.* 22, 631-646.
8. Demska-Zakęś K., 1994. Dyferencjacja płci i cykl rocznego rozwoju gonad hybrydów pelugi i siei (*Coregonus peled* x *Coregonus lavaretus*, *Coregonus lavaretus* x *Coregonus peled*) z dwóch jezior Pojezierza Mazurskiego. *Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, rozprawa doktorska*:1-60.
9. Demska-Zakęś K., 1995. Dyferencjacja płci u ryb. *Komunikaty Rybackie*, 2: 18-19.
10. Demska-Zakęś K., 2005. Wpływ wybranych ksenobiotyków na rozwój układu płciowego ryb. *Rozprawy i Monografie*. Wydawnictwo UWM, Olsztyn s 7-11, ISBN 83-7299-384-X.
11. Demska-Zakęś K., Hliwa P., Zakęś Z., 2005. Hormonalne manipulacje ryb sumokształtnych. W: *Rozród, podchów, profilaktyka ryb sumokształtnych i innych gatunków* (red. Z. Zakęś), Wydawnictwo IRŚ, Olsztyn, s 31-40. ISBN 83-87506-74-5.
12. Devlin R. H., Nagahama Y., 2002. Sex determination and sex determination in fish; an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191-364.
13. Dobosz S., Goryczko K., Łuczyński M., Backiel T., 1995. Growth and survival of two gynogenetic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) groups and their reciprocal crosses. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 42 (3): 257-268.
14. Donaldson E. M., 1996. Manipulation of reproduction in farmed fish. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 1-4.
15. Dowling T. E., Secor C. L., 1997. The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 28: 593-619.
16. Eleraky W., Refat N., Abd nEllatif M., Tahia A., Khedr N., 2011. Effects of nonsteroidal aromatase inhibitor in sex reversal of Nile Tilapia (*Oreochromis*

niloticus). *Nature and Science* 9(12): 145 -150.

17. Garcia de Léaniz C., Verspoor E., 1989. Natural hybridization between Atlantic salmon, *Salmo salar*, and brown trout, *Salmo trutta*, in northern Spain. *J. Fish Biol.* 34, 41-46.

18. Hliwa P., Kuźmiński K., Dobosz S., Nynca J., Dietrich G. J., Ziomek E., Ciereszko A., 2001. Morfologia gonad a jakość nasienia neosamców pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). W: *Nowe gatunki w akwakulturze - rozród, podchów, profilaktyka*, (red. Z. Zakęś, K. Demska-Zakęś, A Kowalska), Wydawnictwo IRS, Olsztyn, s. 105-116. ISBN 978-83-6011-155-0.

19. Ihssen P. E., McHay L. R., McMillan I., Philips R. B., 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis: cytogenetic and fisheries applications. *Trans. Am.Fish. Soc.* 119: 698-717.

20. Jankun M., Ocalweicz K., Woźnicki P., Kuźmiński H., Dobosz S., 2008. Manipulacje genomowe u ryb łososiowatych: znaczenie, procedury i diagnostyka rezultatów. W: *Innowacyjne techniki oceny biologicznej i ochrony cennych gatunków ryb hodowlanych i raków* (red. Demska-Zakęś K.), Wydawnictwo IRS, Olsztyn, s 9-38. ISBN 978-82-60111-28-4.

21. Juchno D., 2004. Rozwój gonad i gametogeneza *Cobitis taenia* L. i naturalnych allopoliploidów *Cobitis* (Pisces, Cobitidae). Mskr. pracy doktorskiej. UWM Olsztyn, 4-10.

22. Kiester A. R., Nagylaki T., Schafer B., 1981. Population dynamics of species with gynogenetic sibling species. *Theoretical Population Biology* 19: 358-369.

23. Komen H., Thorgaard G. H., 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture* 269: 150-173.

24. Kondo M., Nanda I., Hornung U., Asakawa S., Shmizu N., Mitani H., Schmid M., Shima., Scharl M., 2003. Absence of the candidate male sex-determining gene *dmrt1b(Y)* of madaka from other fish species. *Current Biology* 3: 416-420.

25. Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badga R., 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature (London)* 351: 117-121.

26. Kucharczyk D., 2002. Rozród kontrolowany i androgeneza wybranych gatunków ryb

karpioiwatych. *Rozprawy i Monografie. Wydawnictwo UWM, Olsztyn*

27. Kuciński M., Janku M., 2008. Poliploidyzacja jako narzędzie w biotechnologii ważnych gospodarczo i ekologicznie gatunków ryb na świecie. Zakęś i In. (red.). *Biotechnologia w akwakulturze*. IRS, Olsztyn, 15-30.

28. Lin F., Dabrowski K., Luczyński M. J., Luczyński M., 2001. Mosaic individuals found in genetically manipulated northern pike *Esox Lucius* using flow cytometry. *J. Appl. Ichtiol.* 17: 85-88.

29. Mokbel K., 2002. The evolving role of aromatase inhibitors in breast cancer. *The Japan Society of Clinical Oncology* 7: 279-283.

30. Pandian T. J., Koteeswaran R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384: 167-243.

31. Piferrer F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197: 229-281.

32. Potemski P., Płużyńska A., 1998. Inhibitory aromatazy w leczeniu raka piersi. *Onkologia Polska* 3-4: 159-164.

33. Robles V., Cabrita E., Cunado S., Herraiz M. P., 2003. Sperm cryopreservation of sex reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. *Aquaculture* 224: 203-212.

34. Schlosser I.J., Doeringsfield M.R., Elder J.F., Arqayus L.F., 1998. Niche relationships of clonal and sexual fish in a heterogeneous landscape. *Ecology*, 79, 953-968.

35. Simpson E. R., Mahendroo M. S., Means G.D., Kilgore M. W., Hinshelwood M. M., Graham-Lorence S., Amarneh B., Ito Y., Fisher C. R., Michael M. D., 1994. Aromatase cytochrome p 450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Review* 15: 342-355.

36. Solari A. J., 1994. Sex chromosomes and sex determination in fishes. W: Solari A. J. (ed.) *Sex chromosomes and sex determination in Vertebrates*, s.233-247. CRC Press, Tokyo.

37. Wohlfarth G.W., Hulata G., Halevy A., 1990. Survival, sex ratio and growth of some tilapia species and their interspecific hybrids. *Eur. Aquacult. Soc. Spec. Publ.* 11, 87-101

Mezoporowate nanostruktury krzemionkowe jako potencjalny nośnik leków: badania in vitro

Anna Zabłocka, Sylwia Szelaąg, Klaudia Trzeciak

SKN Farmakogenetyki

Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej

Pomorski Uniwersytet Medyczny

Szczecin

Do głównych problemów chemioterapii nowotworów należy ograniczona skuteczność, brak selektywności działania i wynikająca z tego duża toksyczność leków wobec zdrowych tkanek. Zastosowanie mezoporowatych nanostruktur krzemionkowych (MSNs) jako nośników leków mogłoby zwiększyć efektywność terapii i ograniczyć działania niepożądane. Do zalet MSNs należą m.in.: łatwość syntezy i funkcjonalizacji oraz możliwość regulowania średnicy struktur i wielkości porów. Dzięki tym wszystkim cechom MSNs w ostatnich latach zwracają szczególną uwagę badaczy, jako potencjalny nośnik leków przeciwnowotworowych.

Celem przeprowadzonych badań była: 1) ocena biozgodności MSNs, 2) wybór MSNs o średnicy optymalnej do dalszego zastosowania jako nośnika leków, 3) porównanie działania kompleksu MSNs i leku dokсорubicyny (DOX) z działaniem wolnej formy DOX wobec nienowotworowych (L929) i nowotworowych (MCF7) linii komórkowych.

Biozgodność MSNs wobec komórek fibroblastów linii L929 oceniano za pomocą kolorymetrycznego testu WST-1, określającego żywotność komórek na podstawie ich aktywności mitochondrialnej. Komórki hodowano w obecności struktur o średnicach: 50 nm, 70 nm, 80 nm, 100 nm oraz 140 nm w trzech stężeniach: 100 µg/ml, 25 µg/ml i 3.125 µg/ml. Analizę ekspresji genów: proapoptotycznego (Bax) i antyapoptotycznych (Bcl2, BclXL) przeprowadzono metodą PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu sond typu TaqMan. Optymalną średnicę MSNs do zastosowania jako nośnika leków określono za pomocą mikroskopii konfokalnej, analizując efektywność wnikania struktur o różnych średnicach do komórek linii L929. W celu oceny cytotoksyczności kompleksu MSNs-DOX wobec komórek linii L929 i MCF7, prowadzono hodowle komórkowe w trzech grupach badanych: 1) DOX w stężeniach 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 2) MSNs o średnicy 80 nm w stężeniach 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml oraz 3) kompleksu struktury (80 nm) upakowanej DOX. Stężenie badanych związków w stanie niezwiązany odpowiadało ich stężeniu w kompleksie. Żywotność komórek oceniono za pomocą testu WST-1, a komórki traktowane najwyższymi stężeniami badanych związków poddano dodatkowo analizie ekspresji genów Bax, Bcl2, BclXL za pomocą metody PCR w czasie rzeczywistym.

Doświadczenia wykazały, że MSNs o średnicy 50-140 nm są biozgodne w stosunku do komórek linii L929. Również analiza ekspresji genów pro- i antyapoptotycznych nie wykazała istotnych statystycznie zmian w porównaniu do kontroli. Najefektywniejsze wnikanie do komórek linii L929 wykazała struktura o średnicy 80 nm, która została wykorzystana do dalszych badań jako nośnik leku. Kompleks MSNs(80 nm)-DOX wykazywał dwukrotnie niższą toksyczność w porównaniu z wolną DOX wobec komórek linii L929. Natomiast w przypadku komórek linii MCF7 przy najwyższym zastosowanym stężeniu badanych związków zaobserwowano odwrotną zależność: kompleks MSNs-DOX wykazywał silniejsze działanie cytotoksyczne niż wolna DOX. Może to wskazywać na selektywne działanie kompleksu MSNs-DOX, wykazującego zwiększoną toksyczność wobec nowotworowej linii MCF7 i efekt ochronny w przypadku fibroblastopodobnej linii L929, co wraz z potwierdzoną biozgodnością MSNs pozwala na potencjalne zastosowania tych struktur jako nośników leków.

Wstęp

Czym są mezoporowate nanostruktury krzemionkowe?

Mezoporowate nanostruktury krzemionkowe (MSNs) to porowate nanocząstki o średnicy od 20 do ponad 500 nm [1] i wielkości porów w zakresie od 2 do 50 nm [2] (Rys. 1.).

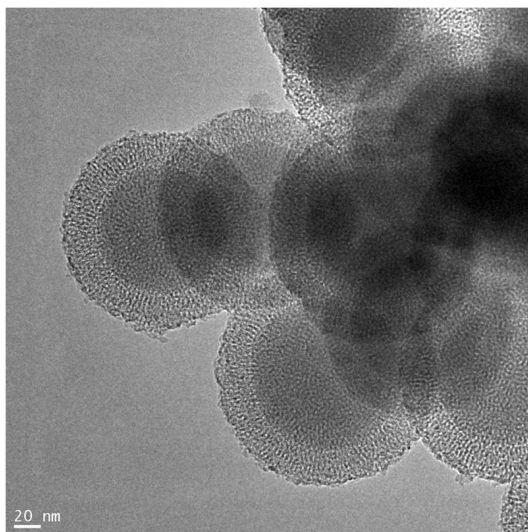
Regulując stężenia użytych odczynników oraz temperaturę mieszaniny reakcyjnej można wpływać na wielkość rdzenia oraz grubość porowatej otoczki. Średnica powstających porów uzależniona jest od zastosowanego surfaktantu [4].

MSNs jako nośnik

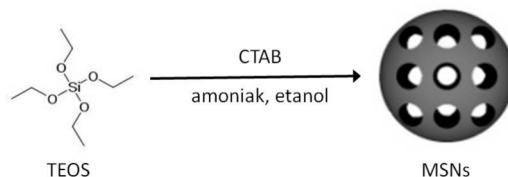
Nanostruktury krzemionkowe w literaturze są prezentowane jako potencjalny nośnik białek, kwasów nukleinowych, barwników fluorescencyjnych oraz leków (Rys. 3.) [5].

Pomysł wykorzystania MSNs w farmakologii i medycynie zrodził się dzięki wielu zaletom, które posiadają te struktury. Sam proces ich syntezy jest tani i nieskomplikowany [5], a także umożliwia kontrolowanie średnicy struktur oraz wielkości porów [6,7]. Ponadto obecność silnych wiązań krzemowo-tlenowych (Si-O) nadaje odporność na działanie czynników zewnętrznych, stres mechaniczny i degradację. Grupy silanolowe ($\equiv\text{Si-OH}$) mające powinowactwo do fosfolipidów umożliwiają aktywne wnikanie cząsteczek do komórek na drodze endocytozy [1].

Grupy hydroksylowe obecne na powierzchni struktur pozwalają na modyfikację ich powierzchni poprzez przyłączanie do MSNs różnych grup funkcyjnych lub cząstek [5]. Ze względu na to zjawisko, możliwa jest taka funkcjonalizacja struktury, dzięki której uzyskuje ona powinowactwo do docelowej tkanki lub receptora, a to z kolei umożliwia dostarczenie danego ma-



Rysunek 1. Wytwarzanie nanostruktur krzemionkowych opiera się na metodzie zol-żel (tzw. metoda Stöbera) [1]. W pierwszym etapie wytwarzany jest rdzeń struktury. W tym celu jako źródło krzemionki wykorzystywany jest ortokrzemian tetraetylu (TEOS), katalizatorem reakcji jest amoniak, a środowisko reakcji stanowi alkohol etylowy. Na bazie wytworzonej litej kulistej struktury powstaje powłoka porowata. W tym etapie również używany jest TEOS, a czynnikiem porotwórczym jest CTAB - bromek cetylotrimetyloamoniowy [3] (Rys. 2.).



Rysunek 2. Schemat przedstawiający syntezę MSNs metodą Stöbera.

teriału do określonego miejsca w organizmie [7].

Porowata powierzchnia struktur, którą tworzy ogromna liczba bardzo małych otworów, powoduje, że nanocząsteczki posiadają bardzo wysoką wartość stosunku powierzchni do objętości. Daje to możliwość załadunku dużej ilości leku, bądź innych cząsteczek i dostarczenia ich do wybranych komórek i tkanek [7].

W porównaniu do tlenków metali, wykorzystywanych do syntezy różnego typu nośników (m.in. tlenek żelaza, tlenek tytanu), nanostruktury krzemionkowe są mniej tok-

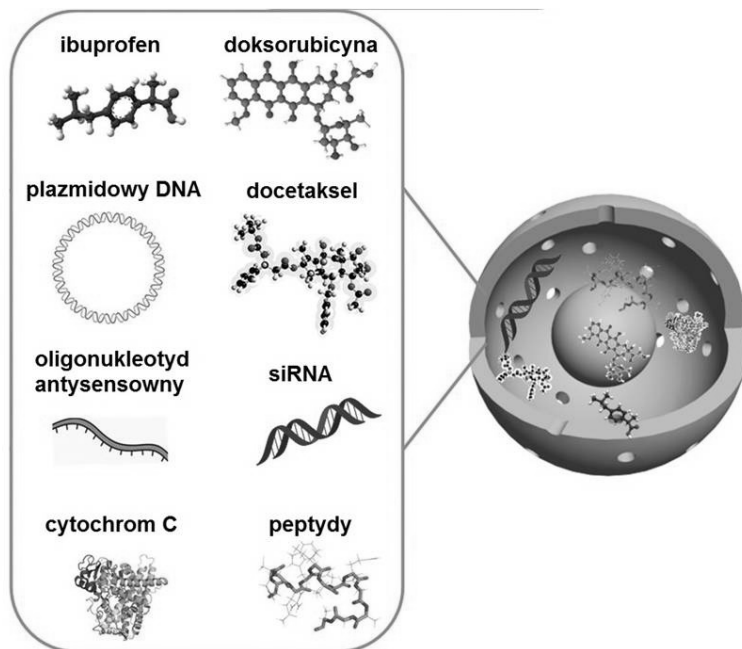


Fig. 3. Mezoporowate nanostruktury krzemionkowe jako uniwersalny nośnik dla wielu różnych cząstek: środki farmaceutyczne (ibuprofen, doksorubicyna, docetaksel), geny terapeutyczne (plazmidowy DNA, oligonukleotyd antysensowny, siRNA) oraz terapeutyczne białka i peptydy (cytochrom c). Zmodyfikowano na podstawie: "Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery" [5].

syczne - wykazują większą biogodność. Z kolei w porównaniu do nietoksycznych liposomów, MSNs wyróżniają się mniejszymi rozmiarami i większą pojemnością w przypadku ich wykorzystania jako nośników leków lub innych substancji aktywnych biologicznie. Ponadto, nanostruktury krzemionkowe są w organizmie bardziej stabilne niż liposomy, co daje możliwość przedłużonego, regulowanego uwalniania dostarczanej substancji [1].

W ostatnich latach przedmiotem szczególnie intensywnych badań jest poszukiwanie nowych nośników, które mogłyby zwiększyć skuteczność leków przeciwnowotworowych. Ze względu na wymienione zalety MSNs prowadzone są prace nad wdrożeniem ich do chemioterapii [1]. Zastosowanie nowych nośników mogłoby zapobiegać powszechnie występującym problemom, jakie towarzyszą terapii przeciwnowotwo-

rowej: ograniczonej skuteczności i selektywności oraz dużej toksyczności.

Przykładem leku, w przypadku którego połączenie z nowym, funkcjonalnym nośnikiem mogłoby przynieść poprawę parametrów farmakokinetycznych i farmakodynamicznych jest doksorubicyna (DOX). Jest to silnie działający lek cytostatyyczny z grupy antybiotyków antracyklinowych, podawany chorym m.in. z rakiem jajnika, sutka, pęcherza moczowego, żołądka, tarczycy, a także w leczeniu choroby Hodgkina, guza Wiliamsa, szpiczaka mnogiego czy ostrej białaczki limfoblastycznej. Pomimo tego, że jest to lek o szerokim spektrum zastosowania, wywołuje wiele działań niepożądanych, które utrudniają terapię. Do najważniejszych z nich należą: kardiotoxyczność, mielotoksyczność, nudności, wymioty, a także owrzodzenie i martwica jelita grubego [8]. Wszystkie te

czynniki powodują, że poszukiwane są nowe możliwości terapii, pozwalające skutecznie walczyć z nowotworem, jednocześnie chroniąc zdrowe tkanki.

Zastosowanie MSNs jako nośnika dla leków cytostatycznych mogłoby potencjalnie skutkować ograniczeniem działań niepożądanych chemioterapii. Lek upakowany w odpowiednio sfunkcjonalizowanej strukturze mógłby zostać dostarczony do guza całkowicie odseparowany od środowiska organizmu i uwolniony dopiero w miejscu pożądanego działania. Spowolniłoby to metabolizm leku i zwiększyło efektywne działanie na komórki nowotworowe, ale przede wszystkim, umożliwiłoby znaczne zmniejszenie oddziaływania cytotoksycznego leku na zdrowe (fizjologiczne) komórki. Ogromne zalety, jakie posiadają MSNs, stanowią szansę do opracowania coraz bezpieczniejszej i zarazem skuteczniejszej terapii przeciwnowotworowej.

W niniejszej pracy przeprowadzone zostały badania, których celem były: ocena biogodności mezoporowatych nanostruktur krzemionkowych, wybór optymalnej średnicy MSNs do zastosowania jako nośnika leków, a także porównanie działania kompleksu MSNs i DOX z działaniem wolnej formy DOX wobec nowotworowych i nie-nowotworowych linii komórkowych.

Materiał i metody

Biozgodność MSNs

W celu oceny biozgodności MSNs mysie fibroblastopodobne komórki linii L929 hodowano w obecności struktur o średnicach: 50 nm, 70 nm, 80 nm, 100 nm oraz 140 nm w trzech stężeniach: 100 µg/ml, 25 µg/ml i 3.125 µg/ml. Hodowlę prowadzono w medium DMEM uzupełnionym o 10% inaktywowaną bydlęcą surowicę płodową (FBS), 2 mM roztwór L-glutaminy oraz 0,4% mie-

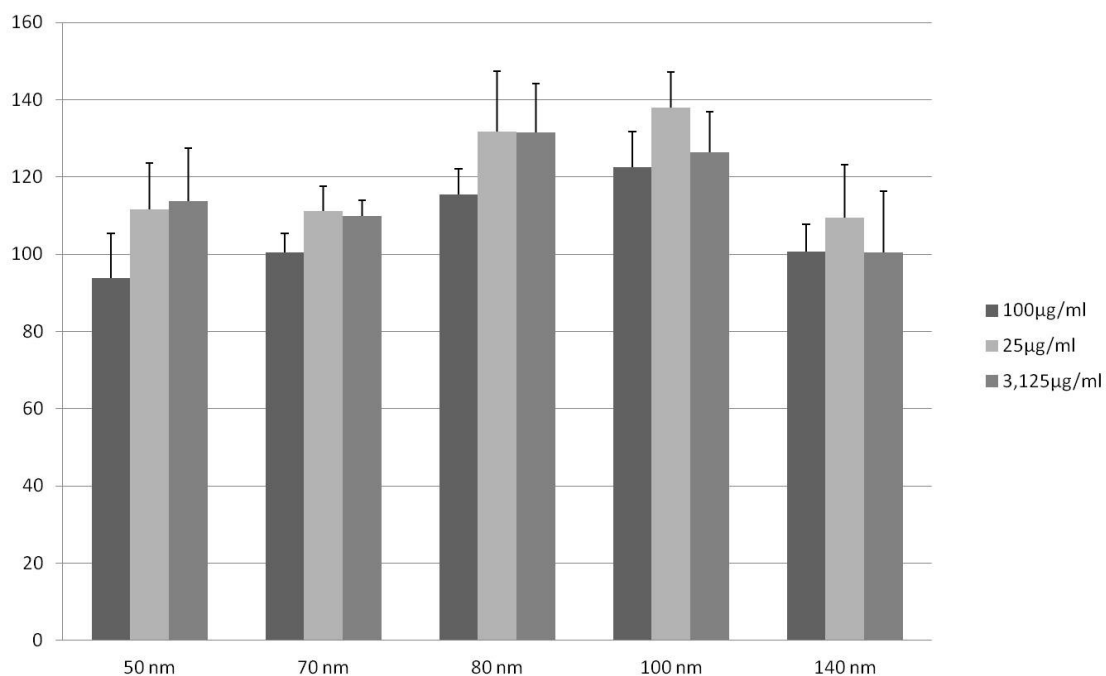
szaninę antybiotyków (penicylina + streptomycyna) w środowisku 5% CO₂ i temperaturze 37°C. Po 24 godzinach wykonano kolorymetryczny test WST-1 (Roche), pozwalający na ocenę żywotności komórek.

Analiza ekspresji genów związanych z regulacją apoptozy

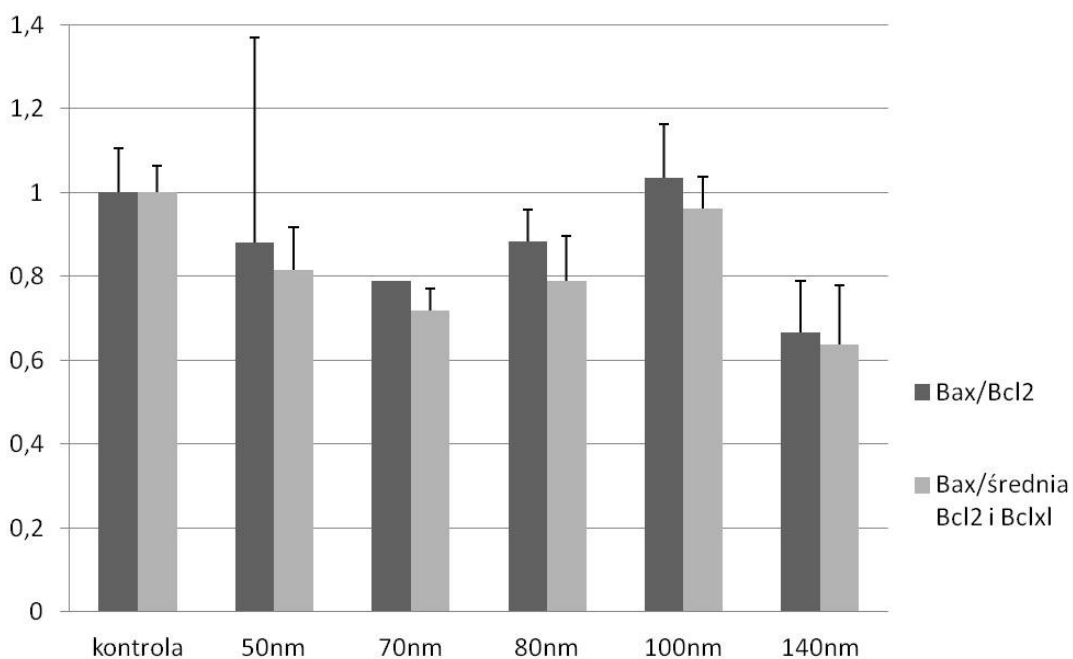
Analizę ekspresji genów: proapoptotycznego (Bax) i antyapoptotycznych (Bcl2, BclXL) przeprowadzono metodą PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu sond typu TaqMan. Całkowite RNA ekstrahowano z komórek za pomocą zestawu Direct-zol (ZymoResearch), a następnie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji w objętości 20 µl, stosując RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific) i startery oligo(dT). Uzyskany cDNA stanowił matrycę do reakcji amplifikacji w czasie rzeczywistym, przeprowadzanej w termocyklerze 7500 Fast rt-PCR System (Life Technologies). Zastosowano gotowe, walidowane przez producenta zestawy, zawierające swoiste startery i sondę (TaqMan Gene Expression Assay, LifeTechnologies). Względną ekspresję poszczególnych genów oceniano metodą Δ CT w odniesieniu do ekspresji genu Actb (kodującego beta-aktynę).

Efektywność wnikania MSNs do komórek

Efektywność wnikania struktur o różnych średnicach do komórek linii L929 oceniono za pomocą mikroskopii konfokalnej. W tym celu komórki inkubowano przez 24 godziny w medium z dodatkiem 100 µg/ml struktur o średnicach: 50 nm, 70 nm, 80 nm, 100 nm oraz 140 nm znakowanych fluorochromem Alexa 647. Po zakończeniu inkubacji komórki utrwalano, jadra wybarwiano DAPI, a błony komórkowe lektyną z kielków pszenicy (WGA) sprzężoną z barwnikiem Alexa 488. Wydajność wnikania MSNs do



Rysunek 4. Ocena żywotności komórek linii L929 z wykorzystaniem testu WST1.



Rysunek 5. Ocena ekspresji genów pro- i antyapoptotycznych komórek linii L929 hodowanych z MSNs o stężeniu 100 µg/ml.

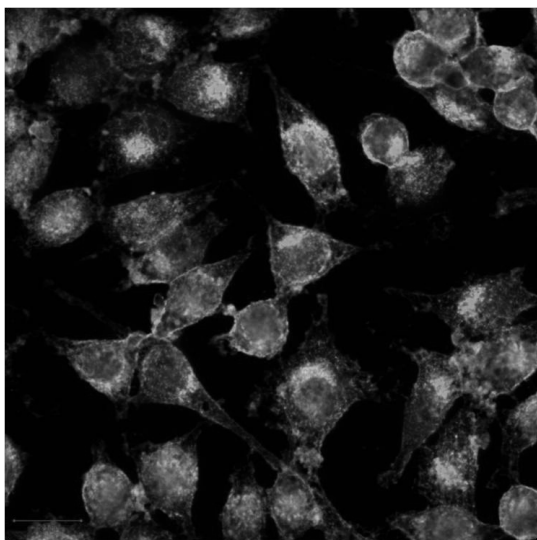
wnętrza komórek oceniano jakościowo na podstawie intensywności świecenia barwnika Alexa 647.

Cytotoksyczność kompleksu MSNs-DOX

Komórki linii L929 (jako modelowe komórki nienowotworowe) oraz komórki ludzkiego raka piersi linii MCF7 hodowano w warunkach opisanych powyżej (2.1.). Hodowle prowadzono z dodatkiem: 1) DOX w stężeniach 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2.5 µg/ml, 2) MSNs o średnicy 80 nm w stężeniach 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml oraz 3) struktury (80 nm) upakowanej DOX. Testowane stężenia MSNs i DOX w kompleksie były równe ich stężeniom w stanie niezwiązanym (w kompleksie DOX stanowiła 20%, a struktura 80% masy). Po 24 godzinach żywotność komórek oceniono za pomocą testu WST-1, a komórki traktowane najwyższymi stężeniami badanych związków poddano dodatkowo analizie ekspresji genów pro- i antyapoptycznych (Bax, Bcl2, BclXL) za pomocą PCR w czasie rzeczywistym.

Metody statystyczne

Zebrane wyniki poddane zostały analizie statystycznej w programie Statistica 10.0 (Statsoft) z wykorzystaniem testu T-Studenta. Za poziom istotności statystycznej



Rysunek 6. Wnikanie MSNs o średnicy 80 nm do wnętrza komórek linii L929.

uznano wartości $p < 0,05$.

Wyniki

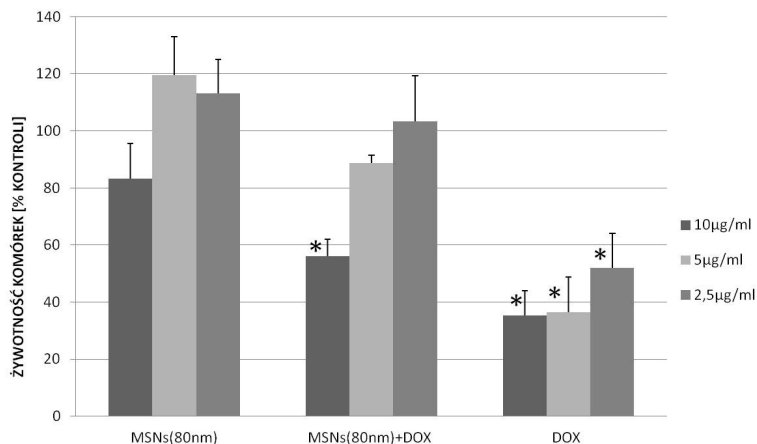
Ocena biogodności MSNs

Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały brak istotnych różnic w żywotności określonej na podstawie wyników testu WST-1 pomiędzy komórkami inkubowanymi z dodatkiem badanych MSNs a komórkami kontrolnymi, bez względu na średnicę oraz stężenie użytych nanostruktur (Rys. 4.). Ponadto nie stwierdzono różnic w ekspresji genów odpowiedzialnych za wejście komórek na drogę apoptozy (Bax), bądź zahamowanie tego procesu (Bcl2, BclXL) (Rys. 5.). Tym samym wykazano, że w analizowanym zakresie stężeń, jak i średnic mezoporowate nanostruktury krzemionkowe są całkowicie biogodne wobec komórek linii L929.

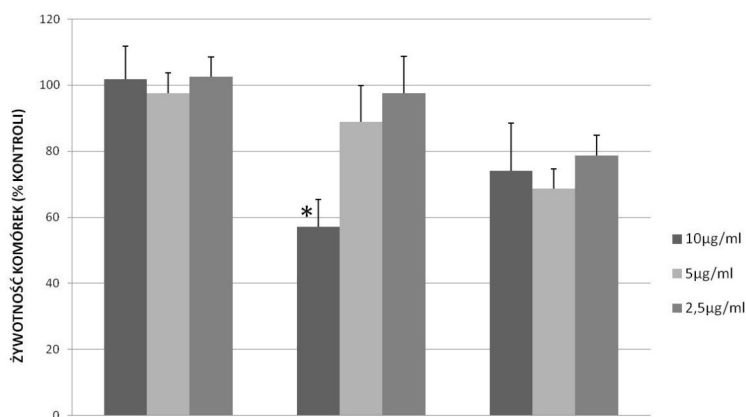
Ze względu na całkowitą biogodność wszystkich testowanych struktur, do dalszych analiz wybrano strukturę o średnicy 80 nm, która według wyników uzyskanych z mikroskopii konfokalnej charakteryzowała się najefektywniejszym wnikaniem do komórek (Rys. 6.).

Ocena cytotoksyczności kompleksu MSNs-DOX

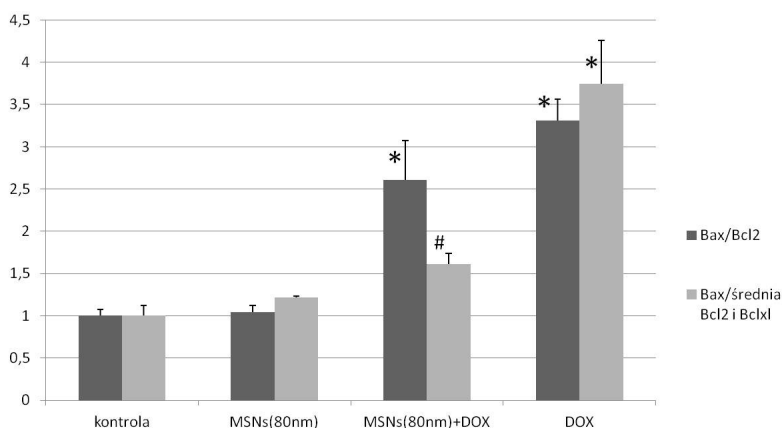
Przeprowadzone badania wykazały, że żywotność komórek linii L929 traktowanych wolną DOX była znacząco niższa we wszystkich testowanych stężeniach. Zastosowanie kompleksu istotnie obniżyło żywotność komórek tylko w przypadku najwyższego stężenia (Rys. 7.). Porównując działanie DOX i kompleksu zaobserwowano, że dokсорubicyna w stężeniu 10 µg/ml obniża żywotność komórek o 37% bardziej niż kompleks, w stężeniu 5 µg/ml jest niemal o 60% bardziej toksyczna, a w najniższym zastosowanym stężeniu (2.5 µg/ml) dwa razy bardziej toksyczna od kompleksu (Rys. 7.).



Rysunek 7. Ocena żywotności komórek linii L929 hodowanych w obecności DOX oraz DOX upakowanej w MSNs. Kontrolę stanowiły komórki hodowane w medium. * - istotność statystyczna w porównaniu do kontroli, $p < 0,05$.



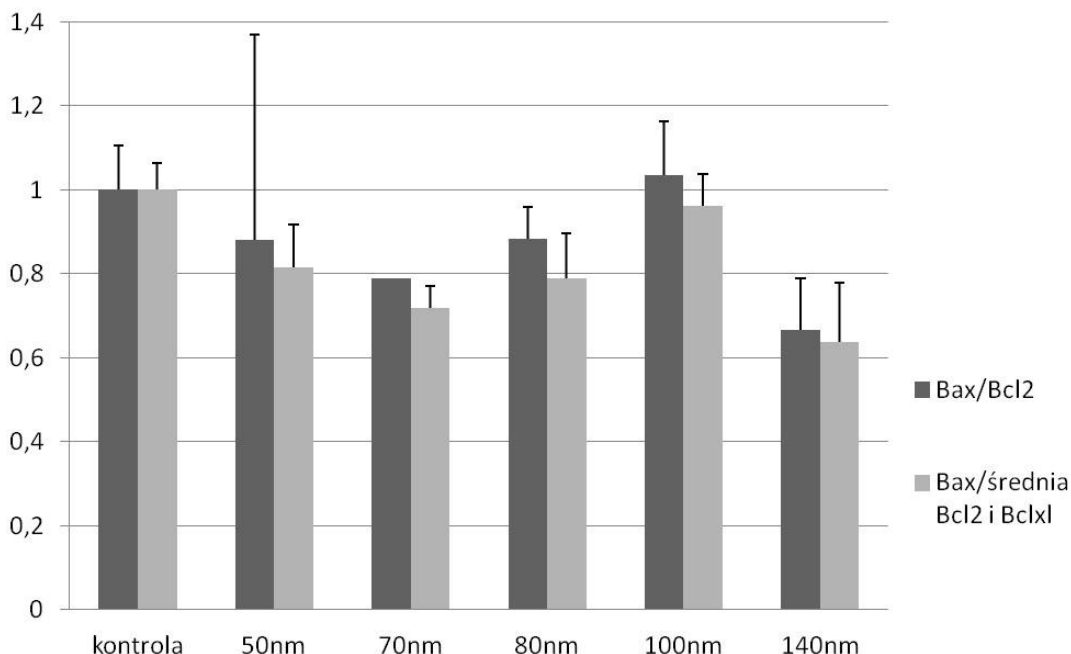
Rysunek 8. Ocena żywotności komórek linii MCF7 hodowanych w obecności DOX oraz DOX upakowanej w MSNs. Kontrolę stanowiły komórki hodowane w medium. * - istotność statystyczna w porównaniu do kontroli, $p < 0,05$.



Rysunek 9. Ekspresja genów pro- i antyapoptotycznych w komórkach linii L929 hodowanych z dodatkiem doksorubicyny wolnej - "DOX", doksorubicyny związanej w kompleksie ze strukturą - "MSNs(80nm)+DOX" oraz z samą strukturą - "MSNs(80nm)". Kontrolę stanowiły komórki hodowane w medium. * - istotność statystyczna w porównaniu do kontroli, $p < 0,05$. # - na granicy istotności statystycznej, $p = 0,053$.

W przypadku linii MCF7 zaobserwowano istotny spadek żywotności komórek tylko w przypadku kompleksu, w którym stężenie DOX wynosiło 10 µg/ml (Rys. 8.). Porównanie toksyczności DOX wolnej do DOX

związanej w strukturze nie wykazało istotnych różnic, jednak w przypadku zastosowania najwyższego stężenia, kompleks wywoływał o 30% silniejsze działanie toksyczne niż DOX. W pozosta-



Rysunek 10. Ekspresja genów pro- i antyapoptotycznych w komórkach linii MCF7 hodowanych z dodatkiem dokсорubicyny wolnej - "DOX", dokсорubicyny związanej w kompleksie ze strukturą - "MSNs(80 nm)+DOX" oraz z samą strukturą - "MSNs(80 nm)". Kontrolę stanowiły komórki hodowane w medium. * - istotność statystyczna w porównaniu do kontroli, $p < 0,05$.

łych stężeniach różnice nie były istotne statystycznie (Rys. 8.).

Analiza RT-PCR komórek linii L929 wykazała istotne nasilenie ekspresji genów promujących apoptozę w porównaniu do kontroli, zarówno w przypadku kompleksu jak i samej dokсорubicyny (Rys. 9.). Porównanie ekspresji proapoptotycznego genu Bax do średniej ekspresji genów antyapoptotycznych Bcl2 i BclXL po zastosowaniu DOX i kompleksu wykazało, że kompleks ponad dwukrotnie słabiej promuje ekspresję genów proapoptotycznych w porównaniu do DOX w stanie wolnym (Rys. 9.).

W przypadku linii MCF7 ekspresja genów proapoptotycznych po zastosowaniu zarówno DOX jak i kompleksu była istotnie wyższa niż w kontroli (Rys. 10.), ale różnice pomiędzy działaniem obu substancji by-

ły niewielkie (około 20%; $p > 0,1$; Rys. 10.).

Dyskusja i wnioski

Nanotechnologia jest dziedziną pręźnie rozwijającą się, a w niektórych dyscyplinach, na przykład w elektronice, niemal niezastąpioną. Jej ogromny potencjał sprawia, że znajduje ona coraz częściej zastosowanie także w medycynie [6]. Jednym z potencjalnych zastosowań nanotechnologii jest użycie nanostruktur w terapii przeciwnowotworowej, która nadal jest mało selektywna i niesie ze sobą liczne działania niepożądane, niekiedy nawet śmiertelne. Idealnym rozwiązaniem byłoby zastosowanie nośnika cytostatyków, który dostarczałby lek i uwalniał go tylko w tkance zmienionej chorobowo, chroniąc tym samym zdrowe tkanki przed działaniem toksycznych substancji. Jednym z rodzajów tego typu nośników leków mogą

okazać się MSNs.

Pierwszym etapem prowadzonych przez nas badań była ocena biogodności MSNs. Obserwowany brak toksyczności struktur w każdym zastosowanym schemacie wobec komórek linii L929 jest dowodem na to, że meziporowate nanostruktury krzemionkowe są zgodne biologicznie. Jest to potwierdzenie prowadzonych wcześniej badań nad biokompatybilnością MSNs [9,10,11], jednak w związku z możliwymi różnicami technologicznymi w procesie wytwarzania struktur, konieczne było przeprowadzenie badań biokompatybilności, dających pewność co do braku toksyczności stosowanych nanocząstek.

Kolejnym etapem było porównanie działania wolnej doksorubicyny oraz doksorubicyny upakowanej w MSNs o średnicy 80 nm na dwie linie komórkowe: linię nienowotworową L929 oraz linię nowotworową MCF7. Analiza ta miała na celu określenie, czy połączenie leku z nośnikiem wpływa na jego toksyczność i swoistość działania wobec różnych komórek.

Analiza żywotności obu linii wykazała, że tylko użycie kompleksu z doksorubicyną o najwyższym stężeniu (10 µg/ml) istotnie obniżało żywotność komórek obu linii, co wydaje się wskazywać na brak swoistości efektu. Ciekawych obserwacji dostarczyło jednak porównanie działania kompleksu MSNs-DOX z działaniem wolnej postaci DOX: w przypadku linii L929 wolna doksorubicyna była bardziej toksyczna dla komórek, podczas gdy w przypadku linii MCF7 przy wysokim stężeniu leku zaobserwowano odwrotną zależność: kompleks MSNs-DOX wykazywał silniejsze działanie niż wolna DOX. Może to wskazywać na selektywne działanie kompleksu MSNs-DOX, wykazującego zwiększoną toksyczność wo-

bec nowotworowej linii MCF7 i efekt ochronny w przypadku fibroblastopodobnej linii L929.

Obserwacje te potwierdziła analiza ekspresji genów związanych z apoptozą. Wybranymi przez nas genami były geny kodujące białka Bax, Bcl-2 i BclXL. Białka należące do podrodziny Bax, czyli Bak, Bax i Bok oraz białka podrodziny BH3-only, takie jak na przykład Bad, Bid, Bim, NOXA, PUMA należą do białek, biorących udział w inicjacji mechanizmów apoptozy [12]. Białka pierwszej podrodziny (Bax), po uwolnieniu z kompleksów z białkami Bcl-2 prowadzą do utraty potencjału błony mitochondrialnej, powodując pobudzenie uwalniania cytochromu c, co w efekcie skutkuje śmiercią komórki. Z kolei funkcją białek BH3-only jest indukcja apoptozy w odpowiedzi na stres komórkowy. Natomiast białka podrodziny Bcl-2, hamują proces apoptozy, poprzez wiązanie proapoptotycznych białek Bax. Do tej grupy należą białka: Bcl-2, BclXL, Bcl-w, Mcl-1 i A1 [12,13,14].

Ocena ekspresji genów pro- i antyapoptotycznych w linii L929 wykazała, że zastosowanie DOX w nanostrukturze słabiej indukowało ekspresję proapoptotycznego genu Bax w porównaniu do zmian w ekspresji obserwowanych w przypadku zastosowania wolnej doksorubicyny. W linii MCF7 zarówno zastosowanie kompleksu jak i wolnego leku wielokrotnie zwiększało ekspresję genów proapoptotycznych w stosunku do genów antyapoptotycznych. Jednocześnie kompleks MSNs-DOX wykazywał silniejsze działanie proapoptotyczne w porównaniu z wolną postacią DOX. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że efekt proapoptotyczny MSNs-DOX może być swoisty dla linii komórkowej, a upako-

wanie leku w nanostrukturze powoduje częściową ochronę komórek linii nienowotorowej przed działaniem cytostatyku. W innych badaniach prowadzonych z użyciem DOX w kompleksie z MSNs, obserwowano istotne zwiększenie siły działania DOX w kompleksie w porównaniu do wolnej formy leku [10,15,16], przy czym efekt ten był bardziej znaczący w porównaniu do obserwowanego w niniejszym badaniu. Przyczyną różnic może być fakt, że obecne badania prowadzone były z użyciem hodowli komórkowych, natomiast badania Wang i wsp. [15] były badaniami *in vivo*, a Meng i wsp. [10] przeprowadzili analizy z użyciem struktur o zmodyfikowanej powierzchni. W obu przypadkach analizowano też wpływ DOX na inne rodzaje nowotworów. Większą toksyczność doksorubicyny w kompleksie z MSNs zaobserwowali także Wang i wsp. [11], jednak w tym przypadku zjawisko to miało miejsce tylko w linii komórkowej MCF7 z nadekspresją genu MDR1 powodującą oporność wielolekową. W przeciwieństwie do uzyskanych przez nas wyników, autorzy nie zaobserwowali wzmocnienia efektu toksycznego w linii MCF7. Należy jednak zaznaczyć, że ekspresja genu MDR1, kodującego glikoproteinę P, jeden z głównych transporterów odpowiedzialnych za wyrzucanie leków (w tym DOX) z komórki, jest procesem indukowalnym i może zależeć, między innymi od warunków hodowli, użytego medium i surowicy, itd. Z kolei obserwowane różnice w reakcji na różne formy leku między liniami komórkowymi mogą być, między innymi, konsekwencją różnic w ekspresji transporterów leków, a także różnic w składzie błony jądrowej, wzorcu metylacji genów regulujących procesy podziałów komórkowych i apoptozy,

czy też dynamiki podziału komórek. Obserwowane w niniejszej pracy silniejsze działanie kompleksu MSNs-DOX na komórki MCF7, w porównaniu do wolnej formy leku sugeruje możliwość przewyciężenia działania transporterów wyrzucających lek, co mogłoby w konsekwencji spowodować zwiększenie skuteczności terapii nowotworów wykazujących wielolekową oporność.

Podsumowując, użycie doksorubicyny zamkniętej w mezoporowatych nanostrukturach krzemionkowych o średnicy 80 nm istotnie zmniejszało wpływ DOX na promocję apoptozy w komórkach nienowotorowych linii L929, wyrażonej jako stosunek genu proapoptotycznego Bax do średniej ekspresji genów antyapoptotycznych Bcl2 i BclXL. Jednocześnie działanie tego cytostatyku na promowanie apoptozy w nowotworowych komórkach linii MCF7 było nieco wyższe (choć nie istotnie statystycznie), gdy DOX używana była w kompleksie z MSNs, w porównaniu z wolną postacią DOX. Wstępne badania żywotności również wykazały słabszy efekt toksyczny kompleksu w odniesieniu do fibroblastów L929 i silniejszy przy inkubacji z modelową linią nowotworową MCF7. Selektywny efekt działania kompleksu może wskazywać, że zamknięcie cytostatyku w nanostrukturze mogłoby przyczynić się do zmniejszenia działania leku wobec zdrowych (fizjologicznych) komórek, nie wpływając jednocześnie na skuteczność doksorubicyny w stosunku do komórek nowotworowych, co ostatecznie prowadziłoby do zwiększenia skuteczności leczenia i ograniczenia działań niepożądanych terapii. Ponadto warto zauważyć, że obserwowane silniejsze działanie kompleksu na komórki nowotworowe nie jest spowodo-

wane funkcjonalizacją stosowanej struktury w kierunku zwiększenia jej powinowactwa do komórek nowotworowych, tak jak w przypadku innych badań [9,10], ale wynika z samej obecności nanocząstki.

W związku z brakiem toksyczności [10], pozytywnymi wynikami dotyczącymi bezpieczeństwa, brakiem akumulacji w narządach oraz doniesieniami o skuteczności MSNs upakowanych cytostatykami w walce z nowotworami [17], można uznać te nanocząstki za potencjalne nośniki leków cytostatycznych, co potwierdzają także

Bibliografia

1. Kwon S., Singh R. K., Perez R. A., Neel E. A. A., Kim H.W., Chrzanowski W., Silica-based mesoporous nanoparticles for controlled drug delivery; *J Tissue Eng.* (2013) Sep 3.
2. IUPAC Reporting Physisorption Data, *Pure Appl. Chem.*, 57 (1985):603-619.
3. Cendrowski K., Peruzynska M., Markowska-Szczupak A., Chen X., Wajda A., Lapczuk J., Kurzawski M., Kalenczuk R. J., Drozdziak M., Miłowska E., Mesoporous silica nanospheres functionalized by TiO₂ as a photoactive antibacterial agent; *Nanomedicine & Nanotechnology* 4, 6 (2013) 1-6.
4. Huang X., Li L., Liu T., Hao N., Liu H., Chen D., Tang F., The Shape Effect of Mesoporous Silica Nanoparticles on Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility in Vivo, *ACS Nano*, 2011, 5 (7), pp 5390-5399.
5. Wu X., Wu M., Zhao J.X., Recent development of silica nanoparticles as delivery vectors for cancer imaging and therapy; *Nanomedicine* (2014) Feb;10(2):297-312.
6. Lu F., Li S.H., Hung Y., Mou C.Y., Size Effect on Cell Uptake in Well-Suspended, Uniform Mesoporous Silica Nanoparticles; *Small* 2009 Jun;5(12):1408-13.
7. Slowing I.I., Vivero-Escoto J.L., Wu C.W., Lin V.S., Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers; *Adv Drug Deliv Rev.* (2008) Aug 17;60(11):1278-88.
8. Chatterjee K., Zhang J., Honbo N., Karliner J.S., Doxorubicin cardiomyopathy; *Cardiology* (2010); 115:155-162.
9. Patel S.P., Patel P.B., Parekh B.B., Application of nanotechnology in cancers prevention, early detection and treatment; *J Cancer Res Ther.* (2014) Jul-Sep;10(3):479-86.
10. Meng H., Xue M., Xia T., Ji Z., Tarn D.Y., Zink J.L., and Nel A.E., Use of size and a co-polymer design feature to improve the biodistribution and

wyniki niniejszego badania. Potrzebne są dalsze badania dotyczące m.in. toksyczności przewlekłej tych nośników oraz poszukiwanie najbardziej optymalnych sposobów ich funkcjonalizacji, jednak można mieć nadzieję, że w przyszłości różnego rodzaju nanostruktury będą bardzo pomocne w optymalizacji terapii przeciwnowotworowej.

- the enhanced permeability and retention effect of doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles in a murine xenograft tumor model; *ACS Nano*. May 24, (2011); 5(5): 4131-4144.
11. Wang X., Teng Z., Wang H., Wang C., Liu Y., Tang Y., Wu J., Sun J., Wang H., Wang J., Lu G., Increasing the cytotoxicity of doxorubicin in breast cancer MCF-7 cells with multidrug resistance using a mesoporous silica nanoparticle drug delivery system; *Int J Clin Exp Pathol.* (2014) Mar 15;7(4):1337-47.
12. Hartman M.L., Czyż M., Mimetiki BH3 jako terapia wspomagająca konwencjonalne leki przeciwnowotworowe, BH3 mimetics as a strategy to complement anticancer therapies (pol); *Postępy Hig Med Dosw.*, (2012); 66: 67-77.
13. Adams J.M., Cory A.; Life-or-death decision by the Bcl-2 protein family, *TIBS* (2001); 26: 61-72.
14. Desagher S, Martinou J-C.; Mitochondria as the central control point of apoptosis; *Trends Cell Biol* (2000); 10: 369-377.
15. Wang T., Chai F., Fu Q., Zhang L., Liu H., Li L., Liao Y., Su Z., Wang C., Duanc B. and Ren D., Uniform hollow mesoporous silica nanocages for drug delivery in vitro and in vivo for liver cancer therapy; *J. Mater. Chem.*, (2011), 21, 5299-5306.
16. Singh N., Karambelkar A., Gu L., Lin K., Miller J.S., Chen C.S., Sailor M.J., Bhatia S.N., Biore sponsive mesoporous silica nanoparticles for triggered drug release; *J Am Chem Soc.* (2011) Dec 14; 133(49):19582-5.
17. Mamaeva V., Rosenholm J.M., Bate-Eyal L.T., Bergman L., Peuhu E., Duchanoy A., Fortelius L.E., Lander S., Toivola D.M., Lindén M., and Sahlgren C., Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery systems for targeted inhibition of Notch signaling in cancer; *Mol Ther.* Aug (2011); 19(8): 1538-1546.

Błonowe transportery dla kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) jako potencjalny cel terapeutyczny dla leków stosowanych w chorobach ośrodkowego układu nerwowego

Adrian Podkowa^{a *}, Karolina Podkowa^b

^aKatedra Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny UJ

^bZakład Neurobiologii, Instytut Farmakologii PAN

adrian.podkova@uj.edu.pl

Kwas gamma-aminomasłowy (gamma-aminobutyric acid - GABA) jest najważniejszym neurotransmiterem hamującym w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN)

u ssaków. GABA działa poprzez pobudzanie trzech rodzajów receptorów, z których najlepiej poznany jest GABAA - receptor związany z kanałem jonowym dla jonów chlorkowych. Efekty farmakologiczne tego neuroprzekaźnika obejmują sedację, działanie przeciwdrgawkowe, przeciwlękowe oraz przeciwbólowe. Postulowana jest również aktywność przeciwdepresyjna wskutek wzmożonej neurotransmisji GABAergicznej. Stężenie GABA jest regulowane poprzez cztery błonowe białka transportujące z rodziny SLC6, uczestniczące w wychwycie zwrotnym tego neuroprzekaźnika. Zgodnie z nomenklaturą zaproponowaną przez Human Genome Organization (HUGO) są to: GAT1, BGT1, GAT2, GAT3. Jedną z możliwości farmakoterapii chorób przebiegających z osłabioną funkcją układu GABAergicznego jest stosowanie substancji hamujących poszczególne transportery GABA. Przykładem takiego leku jest tiagabina, selektywny inhibitor białka przenośnikowego GAT1, stosowany w leczeniu padaczki u ludzi. Tiagabina posiada również właściwości przeciwlękowe, przeciwbólowe oraz przeciwdepresyjne. Przykład tego leku skłania do poszukiwań dalszych aktywnych substancji w grupie inhibitorów transporterów GABA. W niniejszej pracy zostanie przedstawiona charakterystyka farmakologiczna poszczególnych białek przenoszących ten neuroprzekaźnik. Omówione zostanie też działanie substancji wpływających na transport GABA oraz możliwości ich potencjalnego zastosowania w farmakoterapii.

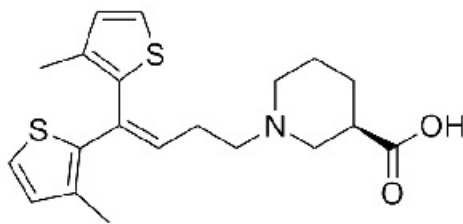
Wstęp

Kwas gamma-aminomasłowy (GABA) należy do głównych neurotransmiterów o aktywności hamującej w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) ssaków. Szacuje się, że nawet połowa synaps w OUN wykorzystuje GABA jako neuroprzekaźnik [1]. Związek ten wykazuje różne kierunki działania, z których najistotniejsze są: aktyw-

ność przeciwdrgawkowa, przeciwlękowa oraz uspokajająca [2]. Dodatkowo GABA posiada właściwości przeciwbólowe i przeciwdepresyjne [3, 4]. Mechanizm działania tego neurotransmitera polega na wiązaniu się z trzema rodzajami receptorów: GABAA, GABAB i GABAC. Receptory GABAA i GABAC należą do receptorów jonotropowych [5], natomiast receptor GABAB to re-

ceptor metabotropowy [6]. Najlepiej dotychczas poznany receptor GABAA jest powiązany z kanałem dla jonów chlorkowych. Pobudzenie receptora GABAA powoduje napływ tych jonów do wnętrza neuronu i w efekcie hiperpolaryzację błony komórkowej.

Działanie fizjologiczne GABA ograniczane jest przez neuronalny lub astrocytarny wychwyt zwrotny tej substancji, w którym biorą udział cztery błonowe transportery (GAT1, BGT1, GAT2 i GAT3). W następstwie usunięcia neurotransmitera ze szczeliny synaptycznej podlega on przemianom (np. w komórkach glejowych) do kwasu glutaminowego (Glu) oraz glutaminy (Gln) [7]. Substancje te są jednocześnie prekursorami, z których syntetyzowany jest GABA w komórkach neuronów presynaptycznych [7]. Najważniejszymi enzymami w szlaku syntezy tego neuroprzekaźnika są glutaminaza, przekształcająca Gln w Glu, oraz dekarboksylaza, pod wpływem której z Glu (główny neurotransmitter pobudzający w organizmie, należący do grupy aminokwasów pobudzających - EAA - excitatory aminoacids) powstaje GABA [7]. Transportery błonowe dla GABA należą do rodziny białek SLC6 (solute carrier-6), która obejmuje również przenośniki innych neurotransmiterów, m.in. dopaminy (DA), noradrenaliny (NA) i serotoniny (5-HT). Hamowanie przenośników GABA znajduje zastosowanie przede wszystkim w farmakoterapii padaczki. Tiagabina (Ryc. 1), selektywny inhibitor GAT1, stosowana jest u ludzi do leczenia częściowych napadów padaczkowych [2, 8]. W tej chwili jest to jedyny lek z grupy hamujących wychwyt zwrotny GABA (poprzez wpływ na transporter dla tej substancji), jednak znane są również inne substancje („narzędzia far-



Rysunek 1. Wzór strukturalny tiagabiny.

makologiczne”) działające w podobny sposób, np. (S)-SNAP-5114 [9], który jednak hamuje przede wszystkim GAT2 i GAT3.

Rodzina białek SLC6

Dotychczas zidentyfikowano u ludzi 19 transporterów z rodziny SLC6 [10]. Wszystkie wykorzystują chemiosmotyczny gradient stężenia jonów Na^+ lub Na^+ i Cl^- po obu stronach błony neuronu do przeniesienia odpowiedniego neurotransmitera wbrew gradientowi jego stężeń [11]. W obrębie rodziny SLC6 można wyróżnić 4 podgrupy:

- przenośniki neurotransmiterów (np. dla GABA - GAT1, GAT2 i GAT3),
- przenośniki aminokwasów (np. dla proliny),
- przenośniki osmolitów (np. dla betainy i GABA - BGT1),
- przenośnik sierocy (ang. orphan) [11].

W Tabeli 1 przedstawione zostały przykłady transporterów należących do rodziny SLC6 - ich nazewnictwo i występowanie. Przenośniki dla GABA zostaną dokładniej opisane w dalszej części pracy.

Interesująca jest nomenklatura białkowych transporterów dla GABA, ponieważ różni się ona w zależności od gatunku ssaka, w którym białko zostało zidentyfikowane (Tabela 2).

W niniejszej pracy zachowany został system nazewnictwa wg HUGO Gene Nomenclature Committee.

Wychwyt GABA za pośrednictwem trans-

Nazwa genu kodującego transporter	Nazwa transportera (białka)	Substrat	Występowanie transportera	Przykłady chorób związanych z nieprawidłową funkcją transportera
SLC6A1	GAT1	GABA	OUN	lęk, padaczka
SLC6A2	NET	noradrenalina	OUN, obwodowy układ nerwowy, łożysko	depresja, choroby układu sercowo-naczyniowego
SLC6A3	DAT	dopamina	mózg, jelita	depresja, choroba Parkinsona
SLC6A4	SERT	serotonina	mózg, obwodowy układ nerwowy, trombocyty	lęk, depresja, zaburzenia obsesyjno-kompulsyjne, autyzm
SLC6A11	GAT3	GABA	mózg	padaczka
SLC6A12	BGT1	GABA, betaina	nerki, wątroba, mózg	padaczka
SLC6A13	GAT2	GABA	mózg, wątroba, siatkówka, płuca	padaczka

Tabela 1 Rodzina białkowych przenośników SLC6 – przykłady transporterów [10, 11].

porterów odbywa się, jak wspomniano wcześniej, wbrew gradientowi stężeń. Jedną cząsteczką GABA transportowaną jest razem z jonami sodowymi i chlorkowymi w stosunku stechiometrycznym 1:2:1. Przenośniki GABA składają się z 12 transmembranowych domen, każda z nich zbudowana jest z około 20 hydrofobowych aminokwasów. Końce N- i C- zawierające miejsca fosforylacji położone są wewnątrzkomórkowo [11].

Transporter GAT1

Przenośnik GAT1 jest najważniejszym i najlepiej poznanym spośród czterech transporterów dla GABA. Występuje przede wszystkim w OUN – w obrębie synaps neuronów GABAergicznym w korze mózgowej, mózdzku, czy hipokampie [11].

Lekiem hamującym selektywnie transporter GAT1 jest tiagabina (Ryc. 1). Jest ona stosowana w leczeniu częściowych napadów padaczkowych u ludzi. Lek ten, będący pochodną kwasu nipekotynowego (sam kwas nipekotynowy również hamuje wychwyt zwrotny GABA, ale nie jest stosowany u ludzi), wykazuje również inne interesujące właściwości farmakologiczne stwierdzone w badaniach zarówno na ludziach, jak i na gryzoniach. Istnieją doniesienia o działaniu przeciwbólowym tiagabiny u pacjentów z bólem przewlekłym [14]. W tym samym badaniu stwierdzono dodatkowo, iż lek ten korzystnie wpływa na parametry snu. Skuteczne działanie tiagabiny w bólu przewlekłym prawdopodobnie wynika ze zwiększania podaży

Gatunek	SLC6A1	SLC6A11	SLC6A12	SLC6A13
Człowiek	GAT-1	GAT-3	BGT-1	GAT-2
Mysz	mGAT1	mGAT4	mGAT2	mGAT3
Szczur	GAT-1	GAT-3	BGT-1	GAT-2
wg Hugo	GAT1	GAT3	BGT1	GAT2

Tabela 2 Nazewnictwo transporterów GABA dla różnych gatunków ssaków [12, 13].

GABA w szczeliny synaptycznej. Neurotransmitter ten jest składową układu antynocycyptowego w OUN. Wiadomo, że osłabione neuroprzekaznictwo GABAergiczne sprzyja rozwojowi bólu neuropatycznego [15]. W badaniach przeprowadzonych na myszach pozbawionych transportera GAT1 stwierdzono występowanie hipotalgezji, czyli podwyższenia progu pobudliwości bólowej [16].

Tiagabina wykazuje również potencjalne działanie przeciwdepresyjne w badaniach przeprowadzonych na myszach [2, 4]. Dodatkowo został stwierdzony jej korzystny wpływ w zwierzęcych testach aktywności przeciwlękowej (test czterech płytek oraz test uniesionego labiryntu krzyżowego) [2]. Przeprowadzono również testy dotyczące aktywności przeciwdrgawkowej tiagabiny u myszy. W teście drgawek kardiazolowych lek ten, w szerokim przedziale dawek, od 6,25 do 50 mg/kg m.c.1, istotnie statystycznie zmniejszał liczbę drgawek oraz wydłużał czas do wystąpienia pierwszego napadu w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt [2]. Aktywność przeciwdrgawkowa tiagabiny (w dawce 50 mg/kg m.c.) została zaobserwowana w teście drgawek indukowanych pilokarpiną, stwierdzono wydłużenie czasu do wystąpienia: tzw. objawów zwiastunowych, stanu padaczkowego i śmierci myszy. Tiagabina wykazywała działanie ochronne, zabezpieczając przed wystąpieniem drgawek indukowanych elektrycznie w teście progu

elektrycznej pobudliwości drgawkowej - w dawce 100 mg/kg m.c. zwiększała wartość CS50 (natężenie prądu, przy którym u 50% myszy występuje toniczny wyprost tylnych kończyn) o ponad 30% w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt [2]. Nie stwierdzono, aby lek ten powodował rozwój zaburzeń poznawczych [17].

Niestety, poza wieloma korzystnymi działaniami, u ludzi tiagabina powoduje istotne efekty niepożądane. Wśród nich należy wymienić zawroty głowy, senność, niepokój, czy też niestabilność emocjonalną [18]. U niektórych pacjentów lek ten może indukować stan padaczkowy (status epilepticus). Ponadto badania porejestacyjne tiagabiny ujawniły zwiększone ryzyko trombocytopenii oraz prowokowania napadów drgawkowych u pacjentów, u których nie zdiagnozowano padaczki, a stosujących ten lek w chorobie afektywnej dwubiegunowej lub bólu neuropatycznym [19]. Niektóre z tych działań niepożądanych wykazano również w badaniach na gryzoniach, na przykład w teście aktywności lokomotorycznej u myszy stwierdzono sedatywne (zmniejszające ruchliwość spontaniczną) działanie tego leku [2].

Transporter GAT2

W przeciwieństwie do GAT1, przenośnik GAT2 występuje nie tylko w mózgu, ale również w innych narządach, takich jak nerki czy wątroba (Tabela 1). Interesujące jest to, iż GAT2 występuje w dużej ilości

w mózgu osesków mysich, natomiast wraz z wiekiem jego ilość się zmniejsza. U dorosłych osobników transporter GAT2 występuje prawie wyłącznie w pajęczynówce [9]. W znacznie mniejszych ilościach jest obecny w neuronach korowych i astrocytach. Wydaje się zatem, iż hamowanie GAT2 ma mniejsze znaczenie jako potencjalny nowy kierunek farmakoterapii schorzeń OUN w porównaniu z GAT1, czy GAT3 [11].

Transporter GAT3

Ten podtyp transportera GABA występuje, podobnie jak GAT1, głównie w OUN i przede wszystkim w komórkach glejowych [11]. Przykładem związku hamującego transporter GAT3 jest (S)-SNAP-5114 [9, 20]. Substancja ta nie jest stosowana w farmakoterapii u ludzi, jednak jest wykorzystywana jako związek referencyjny w testach aktywności przeciwdrgawkowej u gryzoni [21] oraz „narzędzie farmakologiczne” do badań nad właściwościami transportera GAT3. Aktywność farmakologiczna (S)-SNAP-5114 została zbadana na myszach m. in. w testach aktywności przeciwbólowej, przeciwdepresyjnej, przeciwłękowej oraz przeciwdrgawkowej (dane niepublikowane autora). W modelu bólu ostrego indukowanego bodźcem termicznym u myszy (test gorącej płytki) (S)-SNAP-5114 nie wydłużał latencji do wystąpienia reakcji nocyceptywnej u myszy. Natomiast był aktywny w teście przeciągania (model bólu ostrego indukowanego czynnikiem chemicznym - roztworem kwasu octowego), w którym redukował o ponad 50% liczbę „przeciągnięć” tułowia zwierząt, będących reakcją na podany czynnik nocyceptywny (0,9% roztwór kwasu octowego). W badaniu tym została wyznaczona wartość ED50 dla omawianego związku - 8,6 mg/kg m.c. (S)-SNAP-5114

wykazywał również potencjalne właściwości przeciwdepresyjne w teście wymuszonego pływania, skracając czas immobilizacji myszy o około 20% w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt. Natomiast w teście czterech płytek zbadano potencjalne działanie przeciwłękowe tej substancji podanej w dawce 30 mg/kg m.c. i stwierdzono istotne statystycznie zwiększenie liczby przejść „karanych prądem” w porównaniu z grupą kontrolną. Co korzystne, (S)-SNAP-5114 nie powodował zaburzeń koordynacji motorycznej w teście obrotowego pręta, nawet w dawce 100 mg/kg m.c.. Dostępne dane literaturowe dotyczące tej substancji nie potwierdziły natomiast aktywności przeciwdrgawkowej w modelu drgawek indukowanych kardiazolem [9].

Transporter BGT1

Zakres substratowy tego przENOŚNIKA różni się od wcześniej opisanych transporterów, ponieważ oprócz GABA transportuje również betainę. Podobnie jak GAT2, BGT1 występuje zarówno poza OUN (w wątrobie i nerkach), jak również w mózgu - przypuszczalnie w astrocytach [22]. Przenośnik ten należy do podgrupy transporterów osmolitów wg podziału zaproponowanego przez Pramod i wsp. [11]. Istotną rolą, jaką odgrywa BGT1, jest utrzymywanie homeostazy osmotycznej w komórkach rdzenia nerki m. in. poprzez kumulowanie betainy w ich wnętrzu [23]. Wychwyt zwrotny GABA nie jest więc głównym zadaniem tego transportera, choć GABA posiada wyższe powinowactwo do tego przENOŚNIKA niż betaina [11]. Jednocześnie GABA cechuje się wyższym powinowactwem do trzech pozostałych transporterów niż do BGT1 (Tabela 3) [23].

Clausen i wsp. [24] poinformowali o zsynte-

GAT1 (mGAT1)	GAT2 (mGAT3)	GAT3 (mGAT4)	BGT1 (mGAT2)
8	18	0.8	80

Tabela 3 Powinowactwo GABA do poszczególnych transporterów u myszy [23]. W nawiasach podano nazwy transporterów mysich.

tyzowaniu związku hamującego zarówno GAT1, jak i BGT1 – (S)-EF-1502, który miałby wzmacniać przeciwdrgawkowe działanie tiagabiny [23]. (S)-EF-1502 był aktywny w teście drgawek kardiazolowych oraz audiogennych u myszy [25]. Interesujące jest, że połączenie tego związku z tiagabiną nie powodowało u myszy nasilenia działań toksycznych samej tiagabiny. Z drugiej strony istnieją również doniesienia wskazujące na to, iż w badaniach na myszach nie stwierdzono, aby zmiana aktywności BGT1 wpływała na próg drgawkowy [26].

Nieselektywne inhibitory transporterów GABA

Istnieje duża grupa związków, będących nieselektywnymi inhibitorami transporterów GABA, których aktywność farmakologiczna została zbadana na zwierzętach. Należą do nich pochodne zarówno GABA, jak i kwasu gamma-hydroksymasłowego (GHB – gamma-hydroxybutyric acid). Przykładami N-benzyloamidowych pochodnych GHB hamujących wychwyt GABA są związki GT27, GT28, GT29 i BM128 [25]. W teście gorącej płytki działanie przeciwbólne wykazywały GT28 i GT29 (w dawce 25 mg/kg m.c.) [25]. Z kolei wymienione powyżej substancje, z wyjątkiem GT29, działały silnie przeciwdrgawkowo w teście progu elektrycznej pobudliwości drgawkowej w dawce 100 mg/kg m.c, podnosząc wartość CS50 o 65% w przypadku GT28, o 132% - GT27 i o 138% - BM128 [25]. Wszystkie badane związki (w dawkach 30 i 60 mg/kg m.c.) powodowały zmniejszenie

ruchliwości myszy w teście aktywności lokomotorycznej w porównaniu z grupą kontrolną [25]. Te oraz inne nowe inhibitory wychwyty zwrotnego GABA znajdują zastosowanie jako „narzędzia farmakologiczne” do badania właściwości transporterów dla tego neurotransmitera.

Podsumowanie

Transportery GABA występują nie tylko w OUN, lecz również w innych narządach. Ich główną rolą jest wychwyt zwrotny tego neuroprzekaźnika, co może skutkować różnymi kierunkami aktywności farmakologicznej. Przykład tiagabiny pokazuje, iż poprzez hamowanie błonowego przenośnika GAT1 dla głównego neurotransmitera hamującego, uzyskuje się przede wszystkim działanie przeciwdrgawkowe, co umożliwiło zastosowanie tego leku w terapii padaczki (głównie napadów częściowych) u ludzi. Wydaje się, iż warto kontynuować poszukiwania nowych potencjalnych leków o właściwościach przeciwpadaczkowych w grupie inhibitorów GAT1, GAT2, GAT3 i BGT1. Ponadto, opierając się na przykładzie tiagabiny, można przypuszczać, iż związki te mogą wykazywać szereg innych korzystnych działań, jak na przykład aktywność przeciwlękowa, czy przeciwbólowa.

Podziękowania

Część badań opisanych w niniejszej pracy została sfinansowana w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki nr DEC-2012/05/B/NZ7/02705.

Bibliografia

- Kowalczyk P, Salat K, Hofner GC, Guziar N, Filiepk B, Wanner KT, Kulig K: 2-Substituted 4-hydroxybutanamides as potential inhibitors of c-aminobutyric acid transporters mGAT1-mGAT4: Synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med. Chem*, 2013, 21, 5154-5167.
- Salat K, Podkowa A, Kowalczyk P, Kulig K, Dziubina A, Filiepk B, Librowski T: Anticonvulsant active inhibitor of GABA transporter subtype 1 - tiagabine, with activity in mouse models of anxiety, pain and depression. *Pharmacol Rep*, 2014, doi:10.1016/j.pharep.2014.11.003.
- Salat K, Kulig K, Gajda J, Więckowski K, Filiepk B, Malawska B: Evaluation of anxiolytic-like, anticonvulsant, antidepressant-like and antinociceptive properties of new 2-substituted 4-hydroxybutanamides with affinity for GABA transporters in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 2013, 110, 145-153.
- Thoeringer CK, Erhardt A, Sillaber I, Mueller MB, Ohl F, Holsboer F, Keck ME: Long-term anxiolytic and antidepressant-like behavioural effects of tiagabine, a selective GABA transporter-1 (GAT-1) inhibitor, coincide with a decrease in HPA system activity in C57BL/6 mice. *J Psychopharmacol*, 2010, 24 (5), 733-743.
- Hartmann J, Stief F, Draguhn A: Ionotropic GABA receptors with mixed pharmacological properties of GABAA and GABAC receptors. *Eur J Pharmacol*, 2004, 497, 139-146.
- Chen K, Li HZ, Ye N, Zhang J, Wang JJ: Role of GABAB receptors in GABA and baclofen-induced inhibition of adult rat cerebellar interpositus nucleus neurons in vitro. *Brain Res Bull*, 2005, 67 (4), 310-318.
- Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC: GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatr*, 2003, 8 (8), 721-737.
- Sachdeo RC, Leroy RF, Krauss GL, Drake ME Jr, Green PM, Leppik IE, Shu VS, Ringham GL, Sommerville KW: Tiagabine therapy for complex partial seizures. A dose-frequency study. The Tiagabine Study Group. *Arch Neurol*, 1997, 54 (5), 595-601.
- Dalby NO: GABA-level increasing and anticonvulsant effects of three different GABA uptake inhibitors. *Neuropharmacology*, 2000, 39 (12), 2399-2407.
- Chiba P, Freissmuth M, Stockner T: Defining the blanks - Pharmacochaperoning of SLC6 transporters and ABC transporters. *Pharmacol Res*, 2014, 83, 63-73.
- Pramod AB, Foster J, Carvelli L, Henry LK: SLC6 transporters: Structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Mol Aspects Med*, 2013, 34 (2-3), 197-219.
- Madsen KK, White HS, Schousboe A: Neuronal and non-neuronal GABA transporters as targets for antiepileptic drugs. *Pharmacol Ther*, 2010, 125, 394-401.
- Quandt G, Hofner G, Wanner KT: Synthesis and evaluation of N-substituted nipecotic acid derivatives with an unsymmetrical bis-aromatic residue attached to a vinyl ether spacer as potential GABA uptake inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21, 3363-3378.
- Todorov AA, Kolchev CB, Todorov AB: Tiagabine and gabapentin for the management of chronic pain. *Clin J Pain*, 2005, 21 (4), 358-361.
- Gwak YS, Hulsebosch CE: GABA and central neuropathic pain following spinal cord injury. *Neuropharmacology*, 2011, 60 (5), 799-808.
- Xu YF, Cai YQ, Cai GQ, Jiang J, Sheng ZJ, Wang ZG, Fei J: Hypoalgesia in mice lacking GABA transporter subtype 1. *J Neurosci Res*, 2008, 86 (2), 465-70.
- Aikiä M, Jutila L, Salmenperä T, Mervaala E, Kälviäinen R: Long-term effects of tiagabine monotherapy on cognition and mood in adult patients with chronic partial epilepsy. *Epilepsy Behav*, 2006, 8 (4), 750-755.
- http://leki.urpl.gov.pl/files/GabitrilFCT_tablpowl_5mg.pdf - charakterystyka produktu leczniczego Gabitril 5 mg, tabletki [dostęp: 18.01.2015].
- Vossler DG, Morris GL, Harden CL, Montouris G, Faught E, Kanner AM, Fix A, French JA: Tiagabine in clinical practice: effects on seizure control and behavior. *Epilepsy Behav*, 2013, 28 (2), 211-216.
- Dalby NO: Inhibition of g-aminobutyric acid uptake: anatomy, physiology and effects against epileptic seizures. *Eur J Pharmacol*, 2003, 479, 127-137.
- Madsen KK, Clausen RP, Larsson OM, Krogsgaard-Larsen P, Schousboe A, White HS: Synaptic and extrasynaptic GABA transporters as targets for anti-epileptic drugs. *J Neurochem*, 2009, 109 (suppl. 1), 139-144.
- Schousboe A, Larsson OM, Sarup A, White HS: Role of the betaine/GABA transporter (BGT1/GAT2) for the control of epilepsy. *Eur J Pharmacol*, 2004, 500, 281-287.
- Kempson SA, Zhou Y, Danbolt NC: The betaine/GABA transporter and betaine: role in brain, kidney and liver. *Front Physiol*, 2014, doi:10.3389/fphys.2014.00159.
- Clausen RP, Frolund B, Larsson OM, Schousboe A, Krogsgaard-Larsen P, White HS: A novel selective g-aminobutyric acid transport inhibitor demonstrates a functional role for GABA transporter subtype GAT2/BGT-1 in the CNS. *Neurochem Int*, 2006, 48, 637-642.
- Salat K, Kulig K, Salat R, Filiepk B, Malawska B: Analgesic and anticonvulsant activity of new derivatives of 2-substituted 4-hydroxybutanamides in mice. *Pharmacol Rep*, 2012, 64, 102-112.
- Lehre AC, Rowley NM, Zhou Y, Holmseth S, Guo C, Holen T, Hua R, Laake P, Olofsson AM, Poblete-Naredo I, Rusakov DA, Madsen KK, Clausen RP, Schousboe A, White HS, Danbolt NC: Deletion of the betaine-GABA transporter (BGT1; slc6a12) gene does not affect seizure thresholds of adult mice. *Epilepsy Res*, 2011, 95 (1-2), 70-78.

Porównanie efektywności wybranych metod lizy komórek *Streptomyces* spp. w procesie izolacji całego genomowego DNA

Adrian Augustyniak

Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny

Szczecin

Promieniowce z rodzaju *Streptomyces* charakteryzują się wysokim potencjałem biotechnologicznym. Są one powszechnie znanymi producentami antybiotyków, barwników oraz enzymów o znaczeniu przemysłowym. Ich genom składający się zazwyczaj z 8-10 milionów par zasad jest w przypadku licznych szczepów cennym źródłem użytecznych genów, które mogą służyć do celów biotechnologicznych. Izolacja materiału genetycznego tych bakterii bywa jednak problematyczna, dlatego celem badań była ocena efektywności wybranych metod lizy komórek wybranych promieniowców. Materiał badawczy stanowiło 10 szczepów bakterii z rodzaju *Streptomyces*. Drobnoustroje zostały namnożone w podłożu płynnym BHI, komórki następnie poddawano lizie z wykorzystaniem trzech metod: lizy termicznej, lizy termicznej poprzedzonej sonikacją w myjce ultradźwiękowej oraz degradacji enzymatycznej (z użyciem lizozymu i proteiny K). Jakość i czystość wyizolowanych matryc oceniano elektroforetycznie oraz spektroskopowo. Najskuteczniejszą spośród wybranych metod okazała się liza enzymatyczna, gdyż z jej wykorzystaniem udało się uzyskać wysokocząsteczkowe genomowe DNA jednakże o stosunkowo dużym stopniu zanieczyszczenia. W przypadku zastosowania samej lizy termicznej nie udało się wyekstrahować kwasu nukleinowego, natomiast sonikacja, mimo iż wyraźnie zwiększyła efektywność tej metody, powodowała jednocześnie znaczną degradację materiału genetycznego. Uzyskane wyniki dowodzą, iż liza enzymatyczna jest skuteczną i wystarczającą metodą izolacji całego genomowego DNA z komórek promieniowców *Streptomyces* spp.

Wstęp

Gleba jest naturalnym rezerwuarem licznej grupy drobnoustrojów o wysokim potencjale biotechnologicznym. Przykładem są promieniowce, szczególnie z rodzaju *Streptomyces*, które są aktywnymi producentami wielu antybiotyków, enzymów oraz barwników [13, 17, 21]. Te Gram-dodatnie bakterie występują we wszystkich rodzajach gleb. Izolowane były nawet z piasków

pustynnych oraz prób zebranych na Arktyce i Antarktyce [16]. W środowiskach które zasiedlają, odgrywają istotną rolę ekologiczną poprzez m.in. dekompozycję martwej materii organicznej oraz współtworzenie warstwy humusowej gleby i obiegu pierwiastków [5].

Charakterystyczna budowa zarówno morfologiczna, jak i genetyczna *Streptomyces*

spp. oraz zróżnicowana aktywność metaboliczna spowodowały, że bakterie te są nie tylko interesującym materiałem badawczym, ale także istotnym elementem procesów przemysłowych [12]. Wzrost tych bakterii przebiega z wytworzeniem tzw. pseudogrzybni (łac. pseudomycelium) w formie substratowej oraz powietrznej. Z tej ostatniej wytwarzane są spory, które stanowią formę przetrwalną *Streptomyces spp.* w środowisku [4, 5].

Genom omawianych promieniowców, który składa się zwykle z 8-10 milionów par zasad (Mpz) i zawiera nawet 70% par GC, w swojej kompozycji jest liniowy oraz podobny budową do genomu *Borrelia burgdorferi*, czy *Agrobacterium tumefaciens* [2, 4]. Istnieje jednak pewna różnica polegająca na występowaniu na końcach chromosomu *Streptomyces spp.* charakterystycznych białek terminalnych (ang. terminal proteins; TPs), które spinają jego końce i prawdopodobnie uczestniczą w procesie replikacji, pełniąc rolę promotora [19, 20]. Wyróżnia się dwie podstawowe części chromosomu tych promieniowców – rdzeń, w którym znajdują się podstawowe geny metabolizmu (ang. house-keeping genes) oraz ramiona, na których są głównie geny metabolizmu wtórnego oraz końcowe powtórzenia odwrócone (ang. terminal inverted repeats; TIRs) stanowiące niejako telomery chromosomu [4].

Ze względu na specyfikę budowy oraz właściwości warunkujące przystosowanie się tych bakterii do środowiska izolacja DNA bywa problematyczna [6, 9]. Zgodnie z danymi literaturowymi w ścianie komórkowej tych bakterii występują zmodyfikowane kwasy tejchojowe oraz lipotejchojowe, które zmieniają jej wytrzymałość [14, 18]. Wydaje się jednak, że poważniejszym problemem przy izolacji genomowego DNA tych

drobnoustrojów jest występowanie w pobliżu ściany komórkowej licznych nukleaz, które są wysoce specyficzne względem sekwencji zawierających wysoką koncentrację par GC. Te nukleazy są wykorzystywane przez bakterie z rodzaju *Streptomyces* w trakcie procesu programowanej śmierci komórek prowadzącej do przekształcenia pseudogrzybni substratowej w powietrzną [1].

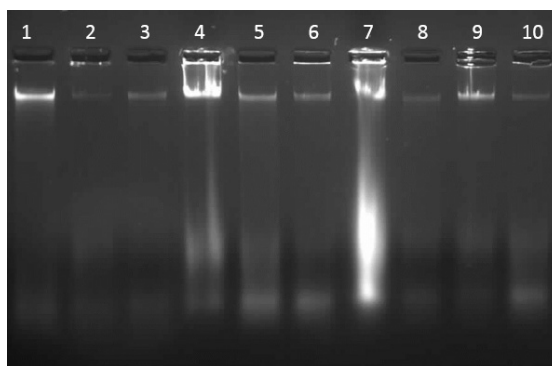
Materiał

Materiał badawczy stanowiło 10 szczepów *Streptomyces spp.* wyizolowanych z gleby ogrodniczej w czystej hodowli, które zostały oznaczone na podstawie cech morfologicznych, biochemicznych oraz obrazu mikroskopowego zgodnie z charakterystyką zawartą w Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012).

Metody

Bakterie były namnażane w postaci czystych kultur w 1 mL płynnego podłoża Brain Heart Infusion Broth (BHI; Oxoid) przez 7 dni w temperaturze 28°C. Hodowle prowadzono w probówkach typu Eppendorf o objętości 1,5 mL. Po procesie inkubacji odwirowywano hodowle przez dwie minuty (16 000 x g) i zlewano supernatant. Następnie zawieszano pelet w 100 µL jałowej wody. W tak przygotowanych próbkach przeprowadzano proces lizy komórek, wykorzystując do tego trzy metody. Pierwszą procedurą wykorzystywaną w izolacji DNA była, zaproponowana przez Oseka i in. [10], metoda termiczna wykonana we własnej modyfikacji polegającej na zwiększeniu objętości próby z 25 µL do 100 µL – w celu ujednolicenia warunków testowych dla wszystkich sprawdzanych metod. Polegała ona na inkubacji prób w termobloku (Peglab HX-1) w temperaturze 99°C przez 10 minut, a następnie ich gwałtownym schłodzeniu w bloku lodowym. Drugą me-

tołą było uzupełnienie lizy termicznej o dodatkową, trwającą 3 minuty sonikację w myjce ultradźwiękowej, zatem dodatkowym czynnikiem lizującym były w tym wypadku fale dźwiękowe. W trzeciej metodzie przeprowadzono enzymatyczną lizę komórek badanych bakterii przy pomocy lizozymu oraz proteiny K (A&A Biotechnology). Próbkę inkubowano z lizozymem (1,68 mg/mL) przez 30 minut, a później z proteinazą K (3,36 mg/mL). W następnym etapie enzymy były inaktywowane w termobloku w temperaturze 70°C przez 10 minut. Jako czynnik precypitujący wykorzystano schłodzenie w bloku lodowym. Próby inkubowano w niskiej temperaturze przez 5 minut, a następnie odwirowywano przez 2 minuty (16000 x g). Ilość i jakość wyizolowanych matryc była oznaczana poprzez pomiar spektrofotometryczny oraz elektroforezę na żelu agarozowym. Pomiar spektrofotometryczny wykonywano z wykorzystaniem płytek 96-dołkowych na spektrofotometrze NanoQuant infinite M200Pro (Tecan). W pomiarze absorbancji zastosowano trzy długości fal – 260 nm (optimum dla DNA), 280 nm (optimum dla białek) oraz 900 nm (pomiar tła). Czystość oceniano na podstawie RATIO 260/280, natomiast stężenie obliczano ze wzoru „ $C = (A_{260} - A_{900}) \times 50$ ”, gdzie „C” oznacza potencjalne stężenie kwasu nukleinowego, „ $A_{260} - A_{900}$ ” to różnica ab-



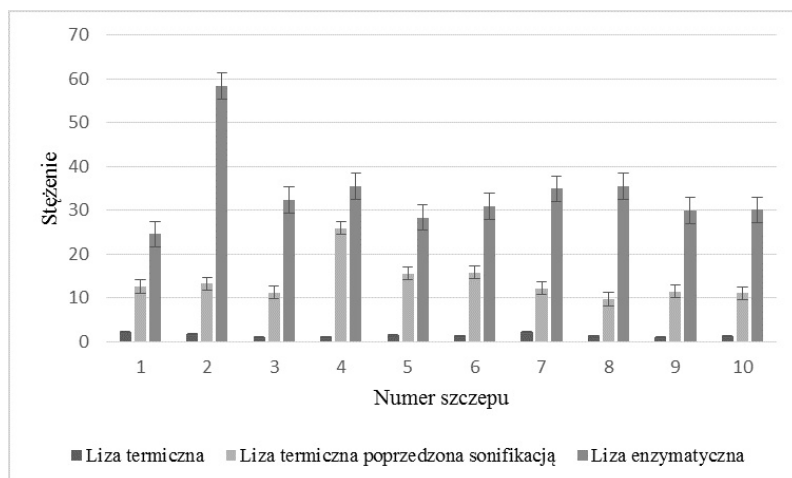
Ryc.1. Elektroforegram ukazujący matryce wyizolowane z wykorzystaniem metody opartej na lizie enzymatycznej; numerami 1-10 oznaczono badane szczepy.

sorbancji uzyskana po odjęciu wyniku tła od wartości uzyskanej w pomiarze DNA. Liczba „50” stanowi współczynnik stosowany w pomiarach DNA dlatego, że dla długości fali wynoszącej 260 nm absorbancja równa 1 jest odpowiednikiem stężenia DNA wynoszącego 50 µg/mL [15]. Do rozdzielów elektroforetycznych sporządzano 2% żel agarozowy (Basica LE Prona) z dodatkiem bromku etyldyny 0,003% (v/v) (Merck) i rozdzielano próbki przy napięciu wynoszącym 90 V przez 60 minut. Analizę statystyczną wyników wykonywano za pomocą programów MS Excel oraz Statistica 10.

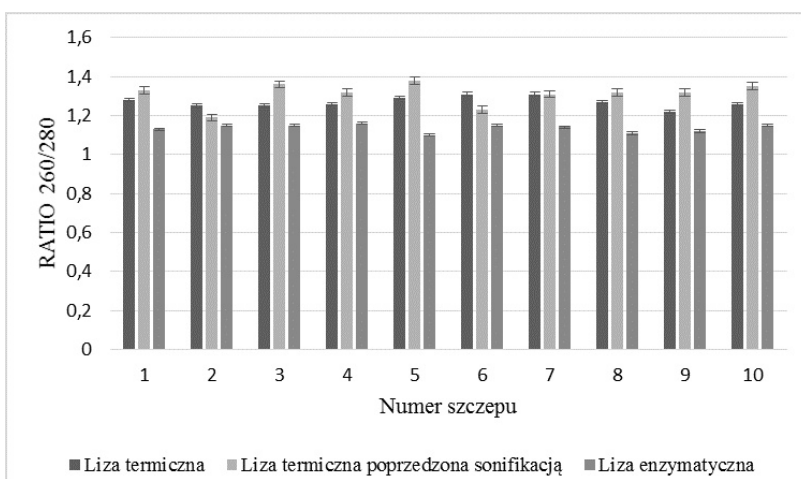
Wyniki

Wyniki analizy spektrofotometrycznej korelowały z obserwacjami dokonanymi przy użyciu elektroforezy na żelu agarozowym. Przy wykorzystaniu techniki lizy termicznej nie uzyskano matryc DNA, które miałyby wystarczającą koncentrację i jakość do zaobserwowania na elektroforegramie. Liza termiczna poprzedzona preinkubacją w myjce ultradźwiękowej poskutkowała natomiast pozyskaniem genomowego DNA jednakże charakteryzującego się niską jakością, co uwidaczniało się w postaci smug (tzw. smirów) w obrazie elektroforetycznym. Liza enzymatyczna jako jedyna z wykorzystanych metod pozwoliła na uzyskanie wysokocząsteczkowego DNA widocznego w postaci regularnych prążków na żelu agarozowym (Ryc. 1).

Poza wyraźnymi prążkami na przedstawionym elektroforegramie zaobserwowano dodatkowo smugi stanowiące zdegradowany materiał genetyczny, podobnie jak w przypadku lizy termicznej poprzedzonej preinkubacją w myjce ultradźwiękowej. Najwyższe stężenie DNA udało się oznaczyć w przypadku lizy enzymatycznej, natomiast najniższe odczytano dla matryc izolowanych z użyciem niemodyfikowanej



Ryc. 2. Porównanie stężeń bakteryjnego DNA wyekstrahowanego z użyciem analizowanych metod lizy komórek *Streptomyces* spp.; numerami 1-10 oznaczono badane szczepy.



Ryc. 3. Porównanie stopnia czystości matryc wyekstrahowanych z użyciem analizowanych metod lizy komórek *Streptomyces* spp.; numerami 1-10 oznaczono badane szczepy.

lizy termicznej (Ryc. 2). Stwierdzono statystycznie istotne różnice pomiędzy uzyskanymi stężeniami względem zastosowanych metod na podstawie testu t-Studenta, przy poziomie istotności $p = 0,05$.

Czystość badanych matryc była najwyższa w przypadku prób uzyskanych po lizie termicznej z preinkubacją w myjce ultradźwiękowej oraz niemodyfikowanej lizie termicznej. Wyniki dotyczące czystości wyizolowanego DNA uzyskane w przypadku tych dwóch metod nie różnią się statystycznie według testu t przy poziomie istotności $p = 0,05$. Odnotowano natomiast statystycznie istotną różnicę pomiędzy

wartościami czystości DNA pomiędzy uzyskanymi po pomiarze eluatów uzyskanych metodami lizy termicznej i lizy enzymatycznej. Niemniej jednak w przypadku żadnej z badanych metod nie oznaczono takiego poziomu czystości matrycy, który byłby wystarczający do wykorzystywania jej w dalszych badaniach bez dodatkowego procesu oczyszczania (Ryc. 3).

Dyskusja

Wysoka temperatura jest czynnikiem, który wykorzystuje się w procesie izolacji genomowego DNA z bakterii [10]. Nie jest ona jednak wystarczającym czynnikiem dla ekstrakcji kwasów nukleinowych z komórek

Streptomyces spp., czego skutkiem był brak sygnału na żelu agarozowym oraz niskie stężenie (sięgające średnio 1,49 µg/mL) w pomiarach na spektrofotometrze. Fakt ten potwierdzają wyniki uzyskane przez Kutchma i in. [6]. Wykorzystanie ultradźwięków podczas preinkubacji w myjce ultradźwiękowej istotnie zwiększyło ilość zebranego DNA, natomiast nie doprowadziło do uzyskania obrazu wysokocząsteczkowych matryc na żelu agarozowym, a tym samym sugerowanego w danych literaturowych podniesienia efektywności [8]. Stężenie kwasów nukleinowych było jednakże na tyle wysokie (średnio 13,91 µg/mL), że możliwe było zaobserwowanie smug świadczących o degradacji materiału genetycznego najprawdopodobniej wskutek fragmentacji spowodowanej przez fale soniczne. Przyczyną degradacji materiału genetycznego mogła być również następująca po etapie sonikacji inkubacja w termobloku. Zakładając, że energia fal dźwiękowych była wystarczająca by zniszczyć komórki, DNA które zostało z nich wyosobnione, podlegało działaniu temperatury wynoszącej 99°C, a zatem wystarczającej do denaturacji podwójnej helisy, co mogło także doprowadzić do degradacji [15]. Problem zdegradowanych matryc dotyczył także prób przeznaczonych do izolacji z wykorzystaniem lizozymu i proteinazy K, mimo że we wszystkich próbach i powtórzeniach uzyskano wysokocząsteczkowe DNA, którego stężenie wynosiło średnio 34,08 µg/mL. Wymienione enzymy są powszechnie wykorzystywane w izolacji kwasów nukleinowych, jednakże w przypadku bakterii z rodzaju *Streptomyces spp.* ich użycie ma dodatkowe znaczenie. Bakterie te w przeciwieństwie do *Nocardia spp.* są wrażliwe na działanie lizozymu [7], zatem ma to także znaczenie taksonomiczne i może stanowić dowód potwierdzający, że wyizolowane matryce pochodzą od bakterii z rodzaju *Streptomyces*. Proteinaza K, poza niszcze-

niem m.in. białek membranowych, jest aktywna także przeciw nukleazom, które u badanych bakterii występują w dużej ilości i stanowią jedną z ich cech charakterystycznych [1, 5]. Dzięki temu wykorzystany enzym dodatkowo zapobiega degradacji materiału genetycznego. Na podstawie uzyskanych wyników i w odniesieniu do badań innych autorów potwierdzono, że dla komórek promieniowców z rodzaju *Streptomyces spp.* wybór metody izolacji materiału genetycznego ma znaczny wpływ na uzyskiwaną efektywność procesu [5, 6, 8].

Otrzymane stopnie czystości niezależnie od metody wskazywały na niską jakość wyizolowanych matryc, co spowodowane było pominięciem etapu oczyszczania DNA z białek i cukrów, które stanowiły komponenty zniszczonych komórek, ich metabolity oraz pozostałe po hodowli komponenty podłoża. Z tego względu bakterie namnażane były w podłożu płynnym, gdyż dla materiału pobieranego z podłoża stałego istnieje duże ryzyko przeniesienia fragmentów podłoża (w tym agaru), co może skutkować jeszcze większym zanieczyszczeniem matryc [5, 12]. Dla czystego kwasu nukleinowego wartość RATIO 260/280 powinna mieścić się w granicach 1,8-2,0. Uzyskane w wyniki kształtują się poniżej poziomu 1,5, który świadczy o dużym zanieczyszczeniu białkami. Gdyby wartości przekroczyły wartość 2,0 prawdopodobne zanieczyszczenie stanowiłyby cukry [15]. Wartości przedstawione na Rycinie 3 uległyby zmianie, gdyby w badaniach zastosowano dodatkowo metodę oczyszczania, np. z wykorzystaniem kolumnienek zawierających złoża krzemionkowe. Inną proponowaną w literaturze metodą zwiększającą czystość eluatów jest wykorzystanie techniki wirowania w gradiencie chlorku cezu [5]. Wydaje się natomiast, iż bardziej precyzyjne oznaczanie stężenia materiału ge-

netycznego byłoby możliwe z użyciem metody opartej na fluorymetrii, która wykrywa specyficzne połączenia między barwnikiem a kwasem nukleinowym. Uzyskane wyniki sugerują, że zgodnie z danymi źródłowymi izolacja genomowego DNA z bakterii *Streptomyces spp.* jest utrudniona [6, 8], nieefektywna w przypadku metod opartych jedynie na lizie termicznej, jednakże możliwa do wykonania z zachowaniem stosunkowo prostego protokołu przy wykorzystaniu lizozymu oraz proteiny K.

Wnioski

Przeprowadzana w jednej probówce liza enzymatyczna ściany komórkowej promieniowców z rodzaju *Streptomyces* połączona z ekspozycją na wysoką i niską temperaturę pozwala na efektywną, a jednocześnie prostą i szybką izolację całego genomowe-

go DNA z komórek tych bakterii.

Wykorzystanie ultradźwięków jako czynnika lizującego ścianę komórkową podnosi efektywność lizy, ale jednocześnie w znaczący sposób wpływa na degradację DNA, co jest zjawiskiem niekorzystnym w kontekście prowadzenia dalszych analiz ukierunkowanych na pozyskanie optymalnych ilości materiału genetycznego.

Poszukiwanie nowych i/lub modyfikowanie istniejących metod umożliwiających wydajną izolację bakteryjnego DNA jest konieczne ze względu na specyficzne cechy morfologiczne komórek bakterii oraz zwiększający się poziom zaawansowania technik badawczych.

Bibliografia:

1. Fernandez M., Sanchez J.: Nuclease activities and cell death processes associated with the development of surface cultures of *Streptomyces antibioticus* ETH 7451. *Microbiology* 2002; 148, 405-412
2. Galperin M.Y. Linear chromosomes in bacteria: no straight edge advantage? *Environmental Microbiology* 2007; 9, 1357-1362
3. Goodfellow M., et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed., Vol. 5: The Actinobacteria. Part B., Springer Verlag, New York, Dordrecht, Heidelberg, London 2012
4. Hopwood D.A. Soil To Genomics: The *Streptomyces* Chromosome. *Annual Review of Genetics* 2006; 40, 1-23
5. Kieser T., et al. *Practical Streptomyces Genetics*. Johnnes inner foundation, Norwich 2000.
6. Kutchma A.J., et al. Small-Scale Isolation of Genomic DNA from *Streptomyces* Mycelia or Spores. *Bio-Techniques* 1998; 24, 452-457
7. Mordarska H., et al. Differentiation of *Nocardioform* Actinomycetes by Lysozyme Sensitivity. *Journal of General Microbiology* 1978; 109, 381-384
8. More M.I., et al. Quantitative Cell Lysis of Indigenous Microorganisms and Rapid Extraction of Microbial DNA from Sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 1994; 60(5), 1572-1580
9. Nikodinovic J., et al. High yield preparation of genomic DNA from *Streptomyces*. *BioTechniques* 2002; 35, 932-936
10. Osek J., et al. Molekularna charakterystyka i analiza klonalna szczepów *Escherichia coli* grupy O157 pochodzących z różnych źródeł. *Medycyna Weterynaryjna* 2002; 58(8), 590-593
11. Papagianni M. Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. *Microbial Cell Factories* 2012; 11:50 (<http://www.microbialcellfactories.com/content/11/1/50>)
12. Picard C., et al. Detection and Enumeration of Bacteria in Soil by Direct DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 1992; 58(9), 2717-2722
13. Raja A., Prabakaran P. Actinomycetes and Drug-An Overview. *American Journal of Drug Discovery and Development* 2011; 1, 75-84
14. Shashkov A.S., et al. Novel teichulosonic acid from cell wall of *Streptomyces coelicolor* M145. *Carbohydrate Research* 2012; 359, 70-75
15. Słomski R., et al. Izolacja DNA. W: *Analiza DNA teoria i praktyka*. Red. R. Słomski. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2011, 44
16. Solecka J., et al. Promieniowce - występowanie i wytwarzanie związków biologicznie czynnych. *Postępy Mikrobiologii* 2013; 52, 83-91
17. Stankovic N., et al. *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Appl. Microbiol. Biot.* 2012; 96, 1217-1231
18. Streshinskaya G.M., et al. A novel teichoic acid from the cell wall of *Streptomyces* sp. VKM Ac-2275. *Carbohydrate Research* 2007; 342, 659-664
19. Tsai H., et al. Linear *Streptomyces* plasmids form superhelical circles through interactions between their terminal proteins. *Nucleic Acids Research* 2011; 39, 2165-2174
20. Tsai H., Shu H., Yang C., Chen C.W. Translesion-synthesis DNA polymerases participate in replication of the telomeres in *Streptomyces*. *Nucleic Acids Research* 2012; 40, 1118-1130
21. Xiong Z., Zhang Z., Li J., Wei S., Tua G. Characterization of *Streptomyces padanus* JAU4234, a Producer of Actinomycin X2, Fungichromin, and a New Polyene Macrolide Antibiotic. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78, 589-592

Zwierzęta laboratoryjne: chów i hodowla w warunkach zgodnych z obowiązującymi normami

Edyta Bańcyr^a, Marcin Żyromski^b

^aKatedra Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

^bKatedra Chemii

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Hodowla zwierząt laboratoryjnych wymaga wielu nakładów pracy na utrzymanie nie tylko odpowiedniego statusu higienicznego osobników, lecz również nakładów pracy na utrzymanie jednorodności i stabilności genetycznej zwierząt. Kluczową rolę odgrywają ludzie, których zadaniem jest nadzorowanie warunków, w jakich bytują zwierzęta oraz przestrzegania zasad ich godnego traktowania w czasie eksperymentów.

Wstęp

Zwierzęta laboratoryjne towarzyszą naukowcom niemalże na każdym kroku. Bez wykorzystania zwierząt doświadczalnych niemożliwe byłoby wprowadzenie na rynek wielu kosmetyków, czy leków. Aspekty moralne i etyczne pracy ze zwierzętami stanowią źródło wielu kontrowersji na linii naukowcy-obrońcy praw zwierząt. Zachowanie odpowiednich warunków hodowla-no-bytowych stanowi kluczowy element warunkujący uzyskanie ważnych i istotnych wyników badań. Nieprzestrzeganie reguł rządzących hodowlą może prowadzić do uzyskania fałszywie pozytywnych wyników badań [1,3].

Zwierzęta laboratoryjne- podział

Do tej pory opracowano wiele podziałów zwierząt laboratoryjnych. Za najważniejsze grupy wyróżniane w podziale uważa się szczepy wsobne, mieszańce oraz zwierzęta gnotobiotyczne, SPF oraz CV [2].

Za szczep wsobny uważamy grupę zwierząt reprezentujących jeden gatunek, charakteryzujących się jednorodnością genetyczną i homozygotycznością. Zasady nazewnictwa wsobnych szczepów szczurów oparte są na tych samych założeniach

co zasady nazewnictwa wsobnych szczepów myszy i opublikowane zostały przez Festinga i Staats w 1973 r. [1,2]. Według tych zasad szczep wsobny powinien być oznaczony jedną lub kilkoma dużymi literami alfabetu łacińskiego.

Mieszańce uzyskiwane ze skrzyżowania dwóch szczepów wsobnych powinny według zasad mianownictwa zawierać w swoim symbolu informację dotyczącą ich pochodzenia. Na pierwszym miejscu umieszcza się zawsze symbol szczepu, z którego pochodzi samica, a następnie rozdzielony znakiem "x" symbol szczepu samca użytego do kojarzeń. Oba zamyka się w nawiasie, po którym wpisuje się numer pokolenia.

Podszczepy stanowią grupy zwierząt wyodrębnione ze szczepu wsobnego mogące się od niego różnić genetycznie w wyniku działania czynników przypadkowych lub zamierzonych. Podszczep oznacza się, wprowadzając do symbolu szczepu rodzicielskiego (wyjściowego) odpowiedni symbol podszczepu, który zwykle stanowi skrót (kod) nazwiska badacza lub nazwy ośrodka, w którym podszczep został wyhodowany.

Zwierzęta gnotobiotyczne:

- germ free (GF) - wolne od wszystkich wykrywalnych mikroorganizmów i pasożytów,
- monobionty - zwierzęta GF celowo zasiedlone jednym mikroorganizmem,
- dibionty - zwierzęta GF celowo zasiedlone dwoma rodzajami mikroorganizmów,
- polibionty - zwierzęta zasiedlone celowo kilkoma rodzajami mikroorganizmów.

Zwierzęta SPF (Specified Pathogen Free)

Zwierzęta konwencjonalne

- CV-I - kontrolowane, utrzymywane w warunkach częściowej izolacji (semi barrier condition)
- CV - hodowla otwarta

Zwierzętarnia

Obowiązujące przepisy dotyczące organizacji wiwarium (zwierzętarni) opierają się na Rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 10 marca 2006 r. ("W sprawie szczegółowych warunków utrzymywania zwierząt laboratoryjnych w jednostkach doświadczalnych, jednostkach hodowlanych i u dostawców").

Pomieszczenia, w których przebywają zwierzęta laboratoryjne, powinny spełniać określone kryteria. Budynek wiwarium powinien znajdować się w miejscu, które umożliwi utworzenie strefy izolującej obiekt od innych budynków. Zwierzętarnia małych gabarytów powinna znajdować się na jednej kondygnacji, być całkowicie wydzielona od reszty budynku.

Powinna posiadać:

- automatycznie regulowaną temperaturę, wilgotność, własną klimatyzację,
- automatyczną regulację oświetlenia, zapewniającą utrzymanie systemu 12h:12h.

Wolnostojący budynek powinien być oddalony od budynków użytkowych o 50-100m, tak aby możliwe było utworzenie pasa sanitarnego izolującego obiekt od innych bu-

dynków. Oś budynku powinna być zgodna z kierunkiem północ-południe, co zapewnia równomierne nagrzewanie ścian.

Ze względu na zakres zadań wyróżnia się zwierzętarnie:

- hodowlane - tutaj prowadzone są prace związane z namnażaniem materiału zwierzęcego,
- hodowlano-eksperymentalne - zwierzęta używane są dla potrzeb badawczych placówki prowadzącej badania,
- eksperymentalne - nastawione wyłącznie na prowadzenie doświadczeń na zwierzętach pochodzących z zakupu.

W zależności od rodzaju prowadzonych badań wyróżnia się dwa typy zwierzętarni eksperymentalnych: do pracy ze zwierzętami zdrowymi i do pracy ze zwierzętami zakaźnymi [5].

W zależności od kategorii zdrowotnej zwierząt stosuje się różne wymagania standardu higienicznego. Zwierzęta konwencjonalne CVI i CVII muszą być utrzymywane w warunkach zapewniających ochronę zwierząt od wpływu czynników zewnętrznych, które groziłyby nieprzewidzianymi zakażeniami. Wyższego standardu wymagają zwierzęta SPF (specified pathogen free), czyli wolne od zakażeń chorobotwórczych specyficznych dla danego gatunku i środowiska. Zwierzęta takie muszą być utrzymywane za barierą, zaś dostęp do pomieszczeń hodowlanych umożliwia system słuz. Cały sprzęt, ściółka itp. muszą być autoklawowane, często do jałowania używa się ozonu, czy promieni UV. Odpowiedni standard higieniczny zwierząt zapewniają również szafy i boksy z laminarnym przepływem powietrza. Najwyższy standard higieniczny charakteryzuje zwierzęta germ free, czyli zwierzęta wolne od wykrywalnych drobnoustrojów.

W celu zapewnienia optymalnych warunków dla wzrostu i rozwoju zwierząt należy uwzględnić wymogi środowiskowe charakterystyczne dla poszczególnych gatunków, a także dopuszczalną liczebność zwierząt przypadającą na 20 m² i mechaniczną wentylację zapewniającą 15 wymian powietrza na godzinę.

Przy planowaniu obiektu przeznaczonego do hodowli zwierząt, należy uwzględnić trzy główne strefy: [1,3]

- część hodowlano-eksperymentalną (zamkniętą),
- część gospodarczo-techniczną (otwartą),
- część socjalno-rekreacyjną (otwartą).

W części hodowlanej oprócz pomieszczeń, w których przebywają zwierzęta, powinien znajdować się podręczny magazyn na czyste wióry, wysterylizowany sprzęt hodowlany i paszę. Ruch w zwierzętarni powinien odbywać się z części zamkniętej do otwartej, nigdy odwrotnie. W przypadku sporządzania zwierząt z zewnątrz powinny one przejść kwarantannę w specjalnie wyznaczonym pomieszczeniu. Pomieszczenia w części hodowlanej powinny być urządzone tak, żeby łatwo można było utrzymać czystość - ważne jest, aby sufity i ściany były gładko wyprawione i pomalowane emulsją, podłogi wykonane z lastryko lub żywicopodobnych materiałów nieścieralnych. Zaleca się, aby pomieszczenia hodowlane nie miały okien i oświetlane były światłem sztucznym w systemie 12h:12h, natężenie światła nie może przekraczać 60 luksów. Nawiew powietrza powinien odbywać się z góry do

doły przy szybkości przepływu powietrza w zakresie 0,1-0,15 m/s w temperaturze 20°C. Regały, na których ustawione są klatki, powinny być zbudowane z materiałów nierdzewnych. Drzwi pomieszczeń hodowlanych muszą być szerokie. W części gospodarczo-technicznej powinna znajdować się zmywalnia, magazyn sprzętu, wiórów, zaplecze techniczne. W części socjalno-rekreacyjnej powinny się znajdować: pokój kierownika, laboratorium oraz pomieszczenia administracyjne. Plastikowe klatki muszą być dezynfekowane w wodzie z detergentem i płynem dezynfekcyjnym. Najlepsze preparaty to 5% r-r chloraminy, lizoforminy lub Virkonu, przy czym środki dezynfekcyjne powinny być zmieniane minimum raz na pół roku. Butelki należy gotować w wodzie destylowanej przez minimum 15 minut. Zwierzęta powinny otrzymywać wodę wysterylizowaną uprzednio w 107°C [2,4].

Podsumowanie

Zapewnienie odpowiednich warunków bytowych jest zgodne z zasadą 3R, na której opierają się akty prawne opisujące w szczegółowy sposób postępowanie w trakcie hodowli, jak i doświadczeń przeprowadzanych na zwierzętach [6]. Odpowiednia opieka pozwala na zapewnienie zwierzętom komfortowych warunków bytowych, dzięki czemu możliwe jest uzyskanie zwierząt zdrowych, które w trakcie eksperymentów będą stanowić dobre i miarodajne modele.

Bibliografia:

1. Szarek J., Szweda M., Strzyżewska E. 2013. Zwierzęta laboratoryjne. Patologia i użytkowanie. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.
2. Brylińska J., Kwiatkowska J. 1996. Zwierzęta laboratoryjne. Metody hodowli i doświadczeń. Wydawnictwo Universitas.
3. Fox J.G., Anderson L.C., Loew F. 2000. Laboratory

animal medicine, 2nd edition. Str. 19-31

4. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, s.60-103. Dostęp online: 22.12.2014 [http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL5_sect_V.pdf]
5. Strony Internetowe: PolLasa, JaxLaboratory
6. Internetowy System Aktów Prawnych

